



**Andreia Maria
Almeida Pinto**

**Efeito da alta pressão na actividade da enzima
peroxidase**



**Andreia Maria
Almeida Pinto**

**Efeito da alta pressão na actividade da enzima
peroxidase**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica do Doutor Jorge Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Aos meus Pais

o júri

presidente

Prof. Doutor Dmitry Victorovitch Evtugin

professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva

investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Sónia Marília de Almeida e Castro

investigadora da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto

agradecimentos

O meu agradecimento ao Doutor Jorge Saraiva, orientador deste trabalho, pelo apoio constante, pela grande ajuda na resolução de problemas e pelo grande incentivo que me incutiu para a realização deste trabalho.

Para os meus pais, todas as palavras são poucas, para descrever o seu apoio e força, a eles o meu muito obrigada, pois foram o meu pilar em toda a vida académica.

Ao Luis pela paciência, apoio e pela força que me transmitiu.

À Ana Luísa Magalhães e à Marisa Valente por tudo o vivido nesta etapa, pela presença constante e pelo incentivo, à Ana Tomás e ao Jorge Rodrigues, amigos de verdade com quem sempre pude contar, amigos que me deram apoio nos momentos em que estava mais fragilizada e com quem partilhei os melhores momentos da vida académica.

À Clara Marques, pela grande ajuda, apoio incondicional e pela sua presença sempre que precisava.

Ao Joeli Olmoz pela ajuda concedida no aparelho de alta pressão.

Para a minha família em geral, agradeço a confiança que sempre demonstraram.

palavras-chave

Peroxidase, Alta Pressão, Catalase, Velocidade máxima, Constante de dissociação, Lineweaver-Burk, Michaelis-Menten

resumo

O objectivo deste trabalho foi a determinação do efeito da alta pressão na actividade e estabilidade da enzima peroxidase (POD).

Assim quantificou-se a actividade da peroxidase do rábano bravo, às pressões de 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa, a duas temperaturas, 20°C e 30°C. Determinou-se a influência da pressão nas constantes cinéticas de Michaelis-Menten (K_M e $V_{máx}$), para os substratos fenol e peróxido de hidrogénio, verificou-se que a enzima em si não é afectada pela pressão, mas as constantes cinéticas são afectadas pela pressão. Para 100 MPa as constantes cinéticas são semelhantes às obtidas à pressão atmosférica, para as pressões superiores, verifica-se uma diminuição das constantes cinéticas à medida que a pressão aumenta. A 20°C o K_M para o peróxido de hidrogénio não é afectado pela pressão.

Para a pressão de 100 MPa, a actividade da peroxidase é ligeiramente superior à actividade desta à pressão atmosférica, para o caso das restantes pressões (200, 350 e 500 MPa), verificou-se que, há uma diminuição gradual da actividade da POD à medida que se aumenta a pressão. Como consequência destes resultados obteve-se três volumes de activação positivos, nomeadamente, 7.56, 6.55 e 5.61 cm³/mol, respectivamente, para o fenol a 30°C, para o peróxido de hidrogénio a 30°C e a 20°C, o que permite concluir que a reacção em estudo é inibida pelo aumento de pressão. As constantes cinéticas obtidas à pressão atmosférica a 30°C, são semelhantes às já reportadas na literatura.

Determinou-se também a actividade da POD a diferentes temperaturas (10, 20, 30 40 e 50°C), à pressão atmosférica, verificando-se que à medida que a temperatura aumenta a actividade da peroxidase também aumenta, tendo-se obtido uma energia de activação de 41.2 kJ/mol.

keywords

Peroxidase, High Pressure, Catalyse, Maximum Speed, Constant of Dissociation, Lineweaver-Burk, Michaelis-Menten

abstract

The main goal of this thesis was the study of the effect of high pressure in the activity and on the kinetic constants of Michaelis-Menten (K_M e V_{max}), stability of the enzyme peroxidase (POD).

The activity of the enzyme was quantified at pressures of 0.1 (atmospheric pressure), 100, 200, 350 e 500 MPa at two temperatures, 20°C e 30°C. It was determined the influence of pressure also on Michaelis-Menten constant (K_M) and v_{max} in relation to the substrates hydrogen peroxide and phenol. It was verified that the enzyme itself is not affected by pressure, but its kinetic constants and its activity are affected by pressure. The kinetic constants determined at the atmospheric pressure at 30°C are similar to those already reported in the literary.

For 100 MPa the kinetic constants are similar to the ones obtained at atmospheric pressure, while for higher pressures, it is verified a decrease of both kinetic constants. At 30°C for both phenol and hydrogen peroxide, K_M and v_{max} decreased linearly with temperature, while at 20°C for hydrogen peroxide K_M was not affected by pressure and v_{max} also decreased linearly with pressure.

At 100 MPa, the activity of peroxidase is slightly higher compared to that verified at atmospheric pressure, but for higher pressures (200, 350 e 500 MPa), it was verified a gradual reduction of the activity. It was verified that the effect of pressure on activity reduction is due to the positive value of the activation volume of the reaction, namely, 7.56, 6.55 and 5.61 cm³/mol, respectively for phenol at 30°C and for hydrogen peroxide at 30°C and 20°C.

The effect of temperature on the activity of the enzyme was also studied at 10, 20, 30 40 and 50°C at atmospheric pressure, and an activation energy of 41.2 kJ/mol was obtained.

Índice

Índice	I
Índice de Figuras	III
Índice de Gráficos.....	IV
Índice de Tabelas.....	VII
Lista de abreviaturas.....	IX
Parte I. Revisão Bibliográfica	1
1-A peroxidase do rabano bravo	1
1.1-Introdução	1
1.2-Classificação da enzima	2
1.3- Estrutura e Função das enzimas	3
1.4-Descrição da Peroxidase (POD)	3
1.4.1-Grupos de Peroxidases	5
1.4.2- Estrutura da peroxidase	6
1.4.3- Aplicações da POD.....	8
1.4.4- Mecanismo de catálise	9
1.4.6- Ciclo Catalítico	12
2-Alta Pressão Hidrostática	13
2.1- Introdução	13
2.2- Efeito das altas pressões nas proteínas	14
2.3- Princípios da alta pressão.....	17
2.4- Efeito da Alta Pressão na Peroxidase	18
Parte II. Método Experimental	21
1-Reagentes.....	21
2-Determinação da Actividade da Peroxidase	21
3-Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten	23
4- Estudo da estabilidade da enzima peroxidase a diferentes pressões	24
5- Estudo da actividade da enzima peroxidase a diferentes temperaturas	25
6- Estudo do efeito da alta pressão nas constantes cinéticas.....	25

Parte III. Resultados e Discussão	27
1-Varição da actividade da peroxidase com a sua concentração	27
2- Cinéticas de Reacção da Enzima Peroxidase (POD) à Pressão Atmosférica	28
2.1- Determinação das Constantes Cinéticas de Michaelis-Menten à Pressão Atmosférica.....	28
3-Efeito da Alta Pressão nas Constantes Cinéticas	39
3.1- Determinação das Constantes Cinéticas em Relação ao Fenol	39
3.2- Determinação das Constantes Cinéticas em Relação ao Peróxido de Hidrogénio a 30°C.....	44
3.3- Determinação das Constantes Cinéticas em Relação ao Peróxido de Hidrogénio a 20°C.....	47
3.4- Variação da constante cinética com a pressão.....	51
3.5- Efeito da pressão na actividade da peroxidase.....	55
4- Volume de Activação.....	58
5- Determinação da Estabilidade da Peroxidase em Tampão Tris-HCl	61
5.1- Actividade da Peroxidase após ser submetida a diferentes pressões.....	61
6- Determinação da Energia de Activação a Diferentes Temperaturas	64
Parte IV. Conclusão.....	67
Bibliografia	69

Índice de Figuras

Figura 1: Representação da peroxidase do rábano bravo, de uma edição do Gerard's celebrated 'Herball. Segundo Gerard's a raiz é longa e grossa, de cor branca[2].	4
Figura 2: Representação da estrutura da ferriprotoporfirina.	6
Figura 3: Representação da sequência de aminoácidos que constituem o rábano bravo[3].	7
Figura 4: Representação da estrutura tridimensional da isoenzima C da peroxidase de rábano bravo, onde o grupo heme se encontra colorido a vermelho e os átomos de cálcio se encontram a azul[2].	8
Figura 5: Representação do ciclo catalítico da peroxidase, onde as constantes k_1 , k_2 e k_3 representam a taxa de formação do composto I, taxa de redução do composto I e taxa de redução do composto II, respectivamente[2].	12
Figura 6: Representação do equipamento de alta pressão.	24

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Variação da actividade da peroxidase, em função da concentração de enzima presente no meio reaccional.	27
Gráfico 2: Representação da actividade da enzima peroxidase, em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, à pressão atmosférica a 30°C. As barras de erro verticais representam o desvio padrão (DP) (duas determinações).	30
Gráfico 3: Representação dos resultados segundo o modelo linear de Lineweaver-Burk (L-B). Inverso da actividade da peroxidase em função do inverso da concentração de peróxido de hidrogénio, à pressão atmosférica a 30°C.	31
Gráfico 4: Representação gráfica da actividade experimental, obtida variando a concentração de peróxido de hidrogénio no substrato à pressão atmosférica, a 30°C, e da actividade teórica obtida a partir dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %).	31
Gráfico 5: Representação da actividade da enzima peroxidase, em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, à pressão atmosférica a 20°C. As barras de erro verticais representam o desvio padrão (DP) (duas determinações).	33
Gráfico 6: Representação dos resultados segundo o modelo linear de Lineweaver-Burk. Inverso da actividade da peroxidase em função do inverso da concentração de peróxido de hidrogénio, à pressão atmosférica a 20°C.	33
Gráfico 7: Representação gráfica da actividade experimental, obtida variando a concentração de peróxido de hidrogénio no substrato à pressão atmosférica, a 20°C, e da actividade teórica obtida a partir dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %).	34
Gráfico 8: Representação da actividade da enzima peroxidase, em função das diferentes concentrações de fenol, à pressão atmosférica a 30°C. As barras de erro verticais representam o desvio padrão (DP) (duas determinações).	36
Gráfico 9: Representação dos resultados segundo o modelo linear de Lineweaver-Burk. Inverso da actividade da peroxidase em função do inverso da concentração de fenol, à pressão atmosférica a 30°C.	37
Gráfico 10: Representação gráfica da actividade experimental, obtida variando a concentração de fenol no substrato à pressão atmosférica, a 30°C, e da actividade teórica obtida a partir dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %).	37
Gráfico 11: Representação das diferentes concentrações de fenol, em função da actividade da enzima peroxidase, para 0.1, 100, 200 e 350 MPa, para 30°C. As barras de erro verticais representam o desvio padrão (DP) (duas determinações para cada)..	40
Gráfico 12: Representação dos resultados segundo o modelo linear de Lineweaver-Burk. Inverso da actividade da peroxidase em função do inverso das diferentes concentrações de fenol, a 0.1, 100, 200 e 350 MPa a 30°C.	41
Gráfico 13: Representação gráfica da actividade experimental, obtida variando a concentração de fenol no substrato a 0.1, 100, 200 e 350 MPa, a 30°C, e da actividade teórica obtida a partir dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %).	42
Gráfico 14: Representação da actividade da enzima peroxidase em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa, para 30°C. As barras de erro verticais representam o desvio padrão (DP) (duas determinações para cada).	44
Gráfico 15: Representação dos resultados segundo o modelo linear de Lineweaver-Burk. Inverso da actividade da peroxidase em função do inverso das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, a 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa a 30°C.	45

Gráfico 16: Representação gráfica da actividade experimental, obtida variando a concentração de peróxido de hidrogénio no substrato a 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa, a 30°C, e da actividade teórica obtida a partir dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %).....	46
Gráfico 17: Representação da actividade da enzima peroxidase, em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa, para 20°C. As barras de erro verticais representam o desvio padrão (DP) (duas determinações para cada).....	48
Gráfico 18: Representação dos resultados segundo o modelo linear de Lineweaver-Burk. Inverso da actividade da peroxidase em função do inverso das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, a 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa a 20°C.....	49
Gráfico 19: Representação gráfica da actividade experimental, obtida variando a concentração de peróxido de hidrogénio no substrato a 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa, a 20°C, e da actividade teórica obtida a partir dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten.....	50
Gráfico 20: Representação dos valores de K_M segundo os dois modelos, o modelo linear de Lineweaver-Burk e o modelo não linear de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %), para o caso do fenol a diferentes pressões, a uma temperatura de 30°C.....	51
Gráfico 21: Representação dos valores de $V_{m\acute{a}x}$ segundo os dois modelos, o modelo linear de Lineweaver-Burk e o modelo não linear de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %), para o caso do fenol a diferentes pressões, a uma temperatura de 30°C.....	51
Gráfico 22: Representação dos valores de K_M segundo dois modelos, o modelo linear de Lineweaver-Burk e o modelo não linear de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %), para o caso do peróxido de hidrogénio a diferentes pressões, a uma temperatura de 30°C.	52
Gráfico 23: Representação dos valores de $V_{m\acute{a}x}$ segundo dois modelos, o modelo linear de Lineweaver-Burk e o modelo não linear de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %), para o caso do peróxido de hidrogénio a diferentes pressões, a uma temperatura de 30°C.	52
Gráfico 24: Representação dos valores de K_M segundo dois modelos, o modelo linear de Lineweaver-Burk e o modelo não linear de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %), para o caso do peróxido de hidrogénio a diferentes pressões, a uma temperatura de 20°C.	53
Gráfico 25: Representação dos valores de $V_{m\acute{a}x}$ segundo dois modelos, o modelo linear de Lineweaver-Burk e o modelo não linear de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %), para o caso do peróxido de hidrogénio a diferentes pressões, a uma temperatura de 20°C.	53
Gráfico 26: Representação da actividade relativa da enzima peroxidase, em função da variação da concentração de fenol, para 30°C.	56
Gráfico 27: Representação da actividade relativa da enzima peroxidase, em função da variação da concentração de peróxido de hidrogénio a 30°C.....	57
Gráfico 28: Representação da actividade relativa da enzima peroxidase, em função da variação da concentração de peróxido de hidrogénio a 20°C.....	58
Gráfico 29: Representação da pressão versus $\ln(V_{m\acute{a}x})$	60
Gráfico 30: Representação dos resultados, obtidos com os dois extractos de peroxidase o que foi submetido a 100MPa durante 10 minutos e, o que ficou à pressão atmosférica. O declive da recta (m) corresponde à actividade da peroxidase, em unidades de Abs 510nm/min.	61

Gráfico 31: Representação dos resultados, obtidos com os dois extractos de peroxidase o que foi submetido a 200MPa durante 10 minutos e, o que ficou à pressão atmosférica. O declive da recta (m) corresponde à actividade da peroxidase, em unidades de Abs 510nm/min.	62
Gráfico 32: Representação dos resultados, obtidos com os dois extractos de peroxidase o que foi submetido a 350MPa durante 10 minutos e, o que ficou à pressão atmosférica. O declive da recta (m) corresponde à actividade da peroxidase, em unidades de Abs 510nm/min.	63
Gráfico 33: Representação da actividade em função do tempo de reacção, para o mesmo meio reaccional a diferentes temperaturas, nomeadamente, 10, 20, 30, 40 e 50°C, à pressão atmosférica.	65
Gráfico 34: Representação do logaritmo da actividade em função do inverso da temperatura e da constante dos gases perfeitos (1/TR). Do declive (m) da recta retira-se a energia de activação (Ea).	66

Índice de Tabelas

Tabela 1: Nomenclatura e classificação das diferentes enzimas[1].....	2
Tabela 2: Propriedades da estabilização de interações nas diversas estruturas das proteínas.[20].....	15
Tabela 3: Valores da actividade da peroxidase em função da concentração de peróxido de hidrogénio, para a pressão atmosférica a 30°C.	29
Tabela 4: Valores do inverso da actividade da peroxidase em função do inverso da concentração do peróxido de hidrogénio, para a pressão atmosférica a 30°C.	30
Tabela 5: Valores das constantes cinéticas, calculadas com base no modelo de Lineweaver-Burk, para a pressão atmosférica a 30°C.....	31
Tabela 6: Valores das constantes cinéticas, obtidas pelo modelo não linear de Michaelis-Menten, para a pressão atmosférica a 30°C e respectivo intervalo de variação a 95% de confiança.....	32
Tabela 7: Valores da actividade da peroxidase em função da concentração de peróxido de hidrogénio, para a pressão atmosférica a 20°C.	32
Tabela 8: Valores do inverso da actividade da peroxidase em função do inverso da concentração do peróxido de hidrogénio, para a pressão atmosférica a 20°C.....	33
Tabela 9: Valores das constantes cinéticas, calculadas com base no modelo de Lineweaver-Burk, para a pressão atmosférica a 20°C.....	34
Tabela 10: Valores das constantes cinéticas, obtidas pelo modelo não linear de Michaelis-Menten, para a pressão atmosférica a 20°C e respectivo intervalo de variação a 95% de confiança.....	34
Tabela 11: Valores da actividade da peroxidase em função da concentração de fenol, para a pressão atmosférica a 30°C.	35
Tabela 12: Valores do inverso da actividade da peroxidase em função do inverso da concentração do fenol, para a pressão atmosférica a 30°C.	36
Tabela 13: Valores das constantes cinéticas, calculadas com base no modelo de Lineweaver-Burk, para a pressão atmosférica a 30°C.....	37
Tabela 14: Valores das constantes cinéticas, obtidas pelo modelo não linear de Michaelis-Menten, para a pressão atmosférica a 30°C e respectivo intervalo de variação a 95% de confiança.....	38
Tabela 15: Valores da actividade da peroxidase em função das diferentes concentrações de fenol, para 100, 200 e 350 MPa a 30°C.	39
Tabela 16: Valores do inverso da actividade da peroxidase em função do inverso das diferentes concentrações de fenol, para 100, 200 e 350 MPa a 30°C.....	40
Tabela 17: Valores das constantes cinéticas, calculadas com base no modelo de Lineweaver-Burk, para 0.1, 100, 200 e 350 MPa a 30°C.	41
Tabela 18: Valores da actividade da peroxidase em função das diferentes concentrações de fenol, para o modelo não linear de Michaelis-Menten, a 100, 200 e 350 MPa a 30°C.....	42
Tabela 19: Valores das constantes cinéticas, obtidas pelo modelo não linear de Michaelis-Menten, para 0.1, 100, 200 e 350 MPa a 30°C e respectivo intervalo de variação a 95% de confiança.....	43
Tabela 20: Valores da actividade da peroxidase em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para 100, 200, 350 e 500 MPa a 30°C.	44

Tabela 21: Valores do inverso da actividade da peroxidase em função do inverso das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para 100, 200, 350 e 500 MPa a 30°C.....	45
Tabela 22: Valores das constantes cinéticas, calculadas com base no modelo de Lineweaver-Burk, para 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa a 30°C.	46
Tabela 23: Valores das constantes cinéticas, obtidas pelo modelo não linear de Michaelis-Menten, para 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa a 30°C e respectivo intervalo de variação a 95% de confiança.....	46
Tabela 24: Valores da actividade da peroxidase em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para 100, 200, 350 e 500 MPa a 20°C.	47
Tabela 25: Valores do inverso da actividade da peroxidase em função do inverso das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para 100, 200, 350 e 500 MPa a 20°C.....	48
Tabela 26: Valores das constantes cinéticas, calculadas com base no modelo de Lineweaver-Burk, para 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa a 20°C.	49
Tabela 27: Valores da actividade da peroxidase em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para o modelo não linear de Michaelis-Menten, a 100, 200, 350 e 500 MPa a 20°C.....	49
Tabela 28: Valores das constantes cinéticas, obtidas pelo modelo não linear de Michaelis-Menten, para 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa a 20°C.	50
Tabela 29: Resultados experimentais da actividade relativa da peroxidase, para diferentes pressões e diferentes substratos de fenol a 30°C.....	55
Tabela 30: Resultados experimentais da actividade relativa da peroxidase, para diferentes pressões e diferentes substratos de peróxido de hidrogénio a 30°C.....	56
Tabela 31: Resultados experimentais da actividade relativa da peroxidase, para diferentes pressões e diferentes substratos de peróxido de hidrogénio a 20°C.....	57
Tabela 32: Valores usados para o cálculo do volume de activação da reacção catalisada pela peroxidase.	59
Tabela 33: Valores dos volumes de activação referentes aos diferentes substratos, nomeadamente, fenol a 30°C, peróxido de hidrogénio a 30°C e peróxido de hidrogénio a 20°C.....	60
Tabela 34: Valores da absorvância a 510 nm, medida ao longo da reacção, com o extracto de peroxidase submetido à pressão de 100MPa durante 10 minutos e com o extracto de peroxidase mantido à pressão atmosférica.	61
Tabela 35: Valores da absorvância a 510 nm, medida ao longo da reacção, com o extracto de peroxidase submetido à pressão de 200MPa durante 10 minutos e com o extracto de peroxidase mantido à pressão atmosférica.	62
Tabela 36: Valores da absorvância a 510 nm, medida ao longo da reacção, com o extracto de peroxidase submetido à pressão de 350MPa durante 10 minutos e com o extracto de peroxidase mantido à pressão atmosférica.	63
Tabela 37: Valores da actividade relativa da peroxidase a diferentes pressões.	64
Tabela 38: Valores essenciais ao cálculo do logaritmo da actividade da peroxidase, para diferentes temperaturas.....	65

Lista de abreviaturas

4-AAP	4-aminoantipirina
A	Factor pré-exponencial de Arrhenius
Abs	Absorvância
Act	Actividade enzimática
ATP	D-glucose 6-fosfotransferase
Ea	Energia de activação
EP	Complexo enzima-produto
ES	Complexo enzima-substrato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HCl	Ácido clorídrico
HRP C	Horseradish Peroxidase isoenzima C
k	Constante de velocidade
K _M	Constante de Michaelis-Menten
L.B.	Lineweaver-Burk
m	Declive
M.M.	Michaelis-Menten
P	Pressão
Patm	Pressão atmosférica
POD	Peroxidase
R	Constante dos gases perfeitos
RZ	Reinhetszahl
S	Substrato
T	Temperatura
v	Velocidade
V	Volume
Va	Volume de activação

$V_{\text{máx}}$

Velocidade máxima

∂

Derivada

Parte I. Revisão Bibliográfica

1-A peroxidase do rábano bravo

1.1-Introdução

Enzimas são catalisadores biológicos (biocatalisadores), de natureza proteica, que aumentam a velocidade das reacções químicas, sem se alterarem, não alterando assim o equilíbrio químico da reacção. As enzimas operam a temperaturas e pressões moderadas bem como em gamas específicas de pH.

Os reagentes envolvidos nas reacções químicas designam-se por substratos, as enzimas actuam de diferentes modos em diferentes substratos, convertendo-os num determinado produto[1].

Para designar as enzimas, Duclaux propôs em 1883 o uso do sufixo “ase”. Este sufixo acrescenta-se a um termo que designa a substância sobre a qual a enzima actua. Neste caso de estudo específico, a enzima designa-se por peroxidase, devido ao facto da enzima actuar sobre o peróxido de hidrogénio (H_2O_2)[1].

A velocidade de uma reacção enzimática, é quantificada pela conversão do número de moles de substrato por unidade de tempo ou o número de moles de produto formado por unidade de tempo. A medição da actividade é fundamental para a caracterização de uma reacção enzimática, sendo que se pode representar através de curvas de reacção em que se verifica um abrandamento da velocidade ao longo do tempo, originada por diferentes motivos, como por exemplo diminuição do grau de saturação da enzima pelo substrato como consequência do desaparecimento do substrato. Por este motivo opta-se por medir as velocidades iniciais[1].

1.2-Classificação da enzima

Devido à enorme diversidade de enzimas conhecidas, os estudos em enzimologia só foram possíveis recorrendo à classificação das enzimas com base em regras de nomenclatura, evitando assim a designação de uma mesma enzima por diferentes nomes. As enzimas podem ser classificadas por diversos critérios, tendo sido estabelecido o mais importante em 1961 pela “Enzyme Commission” da União Internacional de Bioquímica (IUB), que estabeleceu uma classificação e nomenclatura de enzimas. Esta classificação permite a divisão das enzimas em seis classes distintas de acordo com a reacção por cada uma catalisada (Tabela 1)[1].

As enzimas possuem um código constituído por 4 números, precedido das iniciais EC, em que o primeiro dígito se refere à classe a que a enzima pertence, o segundo dígito denomina a subclasse o terceiro a subsubclasse e por fim o último dígito refere-se ao ordenamento da enzima dentro da subsubclasse[1].

Tabela 1: Nomenclatura e classificação das diferentes enzimas[1].

1º Dígito	Classe da Enzima	Tipo de reacção Catalisada
1	Oxido-Redutases	Reacções de oxidação-redução
2	Transferases	Transferência de um átomo ou grupo entre moléculas
3	Hidrolases	Reacções de hidrólise
4	Liasas	Remoção de um grupo de uma molécula (sem ser por hidrólise)
5	Isomerasas	Reacções de isomerização
6	Ligases	Reacções de síntese acopladas à hidrólise de uma molécula de ATP

1.3- Estrutura e Função das enzimas

As enzimas são proteínas com actividade catalítica, sendo que as proteínas são constituídas por aminoácidos que estão ligados entre si, numa ligação que envolve uma reacção (ocorre a perda de uma molécula de água) entre o grupo α -amino de um aminoácido e o grupo α -carboxilo de um outro aminoácido adjacente, formando-se assim a ligação peptídica [1].

A estrutura tridimensional característica das proteínas, deve-se ao facto de em certas condições fisiológicas a cadeia de aminoácidos que constitui a enzima ter um enrolamento espontâneo resultando nessa mesma estrutura. A complexidade da mesma provém das diferentes possibilidades de rotação dos aminoácidos, em torno das ligações covalentes simples, resultando assim diferentes arranjos tridimensionais não sobreponíveis, originando diferentes conformações de uma mesma enzima. Normalmente existe apenas uma única conformação, conformação nativa, na qual a enzima mantém o seu máximo potencial activo, a sua actividade biológica [1].

1.4-Descrição da Peroxidase (POD)

O rábano bravo (Horseradish) é uma planta perene, cultivada em regiões temperadas, sendo as suas raízes fontes de diversas aplicações, que de acordo com dados publicados, são longas, grossas, de cor branca e gosto muito apurado[2] (Figura 1). O rábano bravo é uma fonte rica em peroxidase (E.C.1.11.1.7), sendo esta uma das enzimas mais amplamente encontradas no reino animal e vegetal. Esta enzima é uma oxi-redutase, que contém um heme e utiliza o peróxido de hidrogénio para oxidar uma vasta variedade de compostos orgânicos e inorgânicos[2,3].

Esta enzima é frequentemente usada em química analítica devido as suas propriedades, capazes de proporcionar respostas estáveis por longos períodos de tempo, à temperatura ambiente e numa vasta gama

de pH, sabendo-se que esta é termicamente estável em pH neutro e para pH de 5 e 8 reduz a sua resistência ao calor para cerca de metade. A peroxidase de rábano bravo pode ser encontrada em diferentes graus de pureza[4]. A POD é conhecida como uma das enzimas mais estáveis a diversas temperaturas. Por isto esta enzima é usada como base de referência para outras enzimas, pois quando esta está inactivada as outras enzimas também estão[5].



Figura 1: Representação da peroxidase do rábano bravo, de uma edição do Gerard's celebrated 'Herball. Segundo Gerard's a raiz é longa e grossa, de cor branca[2].

O termo rábano bravo é usado de uma forma generalizada, no entanto as raízes desta planta têm até à data de hoje, diversas isoenzimas de peroxidase identificadas, onde a isoenzima C (HRP C) é a mais abundante e também a mais estudada. Estas isoenzimas diferem entre si tanto a nível molecular como a nível cinético, no entanto, catalisam reacções idênticas. As isoenzimas da peroxidase podem diferir entre si em relação à massa molecular, ponto isoeléctrico, pH, temperaturas óptimas, estabilidade térmica, especificidade de substratos e composição e sequências de aminoácidos. O amadurecimento dos frutos pode também provocar alterações na actividade total da peroxidase bem como nas suas isoenzimas[2,3,6,7].

1.4.1-Grupos de Peroxidases

As peroxidases podem ser englobadas em dois grupos principais: as ferropoteínas e as flavonóides. As enzimas englobadas no primeiro grupo (ferropoteínas) podem ainda ser subdivididas em dois grupos distintos, nomeadamente, peroxidases ferriprotoporfirinas e verdoperoxidases[8].

No grupo que engloba as ferriprotoporfirinas encontram-se as peroxidases de plantas superiores, estas caracterizam-se por possuírem a ferriporfirina IX, e por isso quando purificadas, apresentam cor castanha. Devido à ferriporfirina IX, estas peroxidases têm absorção máxima em diversos comprimentos de onda, 403, 497, 641,5 nm e a 208 e 275 nm devido a resíduos de tirosina, triptofano e fenilalamina. O RZ (Reinhetszahl) é o valor da razão entre a absorção a 403 e 208 nm, este valor é utilizado para indicar a pureza de uma preparação de peroxidase. O valor de RZ tem desvantagens, tais como, o facto de ser diferente para peroxidases provenientes de fontes distintas, este valor varia entre 2,50 e 4,19 para as diversas formas do rábano brabo, este mesmo valor refere-se à pureza da enzima como proteína e não à sua actividade[8].

O grupo prostético das verdoperoxidases é também constituído por um núcleo porfirínico contendo um ião ferro III, no entanto, este grupo difere da ferriprotoporfirina IX. Este tipo de enzimas, verdoperoxidases, encontram-se nos animais e no leite, quando purificadas apresentam cor verde, devido à sua absorvância máxima se encontrar entre 570 e 690 nm[8].

As flavoproteínas foram purificadas em microrganismos, em diferentes *streptococci* e em tecidos animais, e têm como grupo prostético o dinucleótido de adenina e flavina (FAD)[8].

As peroxidases podem ser classificadas com base na superfamília a que pertencem, esta divisão tem como base a origem da peroxidase, origem animal ou origem vegetal. Existem três classes distintas de peroxidases, classe I que engloba as peroxidases intracelulares, classe II

que é constituída por peroxidases fúngicas extracelulares, classe III onde pertencem as peroxidases vegetais extracelulares. A distinção entre as classes foi inicialmente baseada na comparação de sequências de aminoácidos, sendo actualmente baseada em dados da estrutura tridimensional. A peroxidase de rábano bravo (HRP) faz parte da classe III.

1.4.2- Estrutura da peroxidase

Esta enzima pertence à família das proteínas com ferriprotoporfirina (Figura 2) como grupo prostético, é uma glicoproteína constituída por 308 aminoácidos, dois tipos de centros metálicos, um grupo prostético, nomeadamente a ferriprotoporfirina IX (com um átomo de Fe^{3+}) e dois átomos de cálcio (Ca^{2+}). Quer o ferro quer os átomos de cálcio são essenciais para a integridade funcional como para a estrutura da enzima. A perda dos átomos de cálcio pode resultar tanto na diminuição da actividade enzimática como na diminuição da estabilidade térmica[2,3,7].

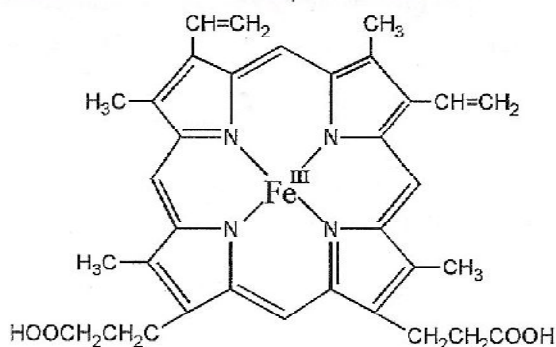


Figura 2: Representação da estrutura da ferriprotoporfirina.

O resíduo N-terminal está bloqueado na forma de piroglutamato e o resíduo C-terminal é heterogéneo, com algumas moléculas sem Ser308 (resíduo terminal). Existem quatro pontes de dissulfureto entre os resíduos de cisteína, 11-91, 44-49, 97-301 e 177-209 e ainda uma ponte salina colocada entre Asp99 e Arg123. São conhecidos nove potenciais locais de N-glicosidação na sequência primária, desde a sequência Asn-X-Ser/Thr (onde X representa um resíduo aminoácido), destas nove oito são ocupadas. A cadeia heptassacarídica representa 75 a 80% de glicanos, no entanto o perfil dos hidratos de carbono da HRP C é heterogéneo, sendo por isso muito poucos os glicanos que estão caracterizados (Figura 3) [2].

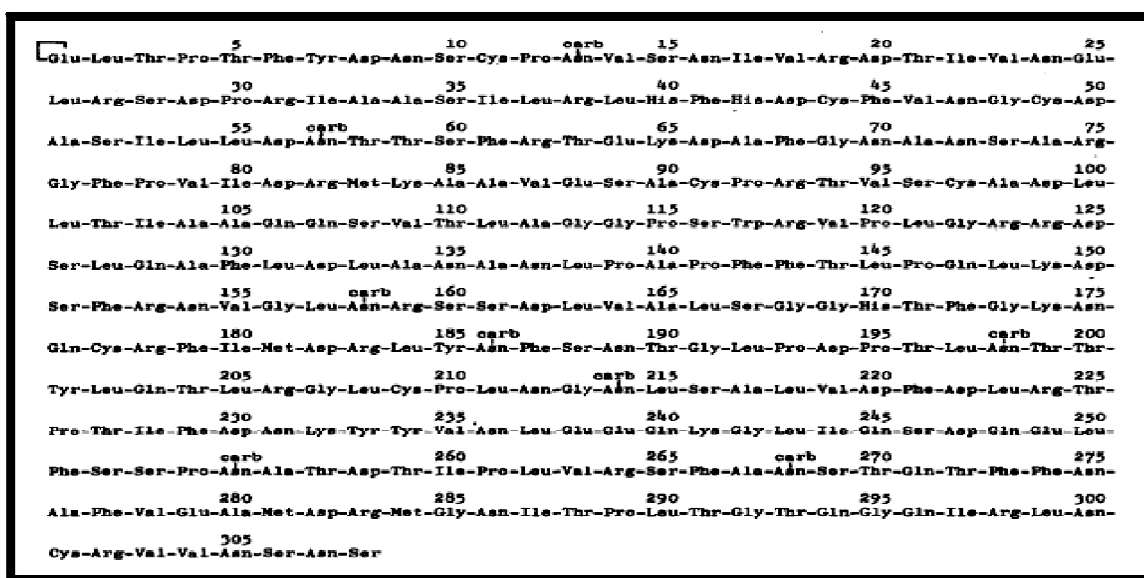


Figura 3: Representação da sequência de aminoácidos que constituem o rábano bravo[3].

No decorrer dos últimos anos ficou disponível a estrutura tridimensional da peroxidase (Figura 4), por cristalografia de raio x, bem como a descrição dos intermediários no ciclo catalítico da mesma com alta resolução. A enzima possui dois domínios, o domínio distal e o proximal e entre estes encontra-se o grupo heme. Estes dois domínios surgiram provavelmente de uma duplicação genética, facto

apoiado pela presença comum de átomos de cálcio e outros elementos estruturais[2].

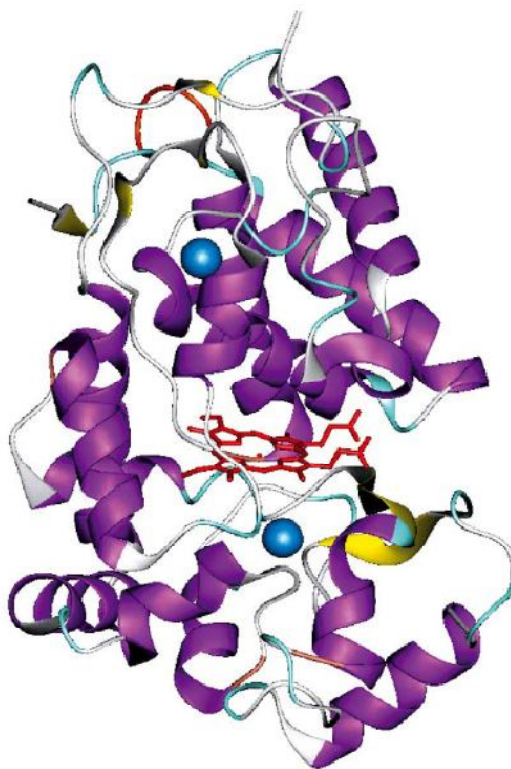


Figura 4: Representação da estrutura tridimensional da isoenzima C da peroxidase de rábano bravo, onde o grupo heme se encontra colorido a vermelho e os átomos de cálcio se encontram a azul[2].

1.4.3- Aplicações da POD

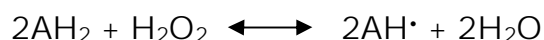
As aplicações comerciais onde se usa a peroxidase são diversas, como por exemplo, é usada em componentes de diagnósticos clínicos, a nível alimentar, em sistemas de bio-sensores, é utilizada também em indústrias de lacticínios para a detecção de antibióticos presentes no leite e no tratamento de efluentes industriais perigosos[2,6,7].

O facto de as enzimas poderem ser imobilizadas faz destas catalisadores reutilizáveis, tornando assim este processo economicamente viável, suscitando um crescente interesse pela peroxidase, especialmente de rábano bravo, como fonte de tratamento

de efluentes industriais perigosos (uma molécula de peroxidase remove até cerca de 10^3 moléculas de fenol[9]). Esta enzima tem sido estudada desde a década de 1980, devido às suas propriedades adequadas para efeitos de descontaminação de solos e efluentes industriais (ampla especificidade de substrato e estabilidade a diversas gamas de pH e temperatura) e também pela facilidade de obtenção desta no mercado[10-12].

1.4.4- Mecanismo de catálise

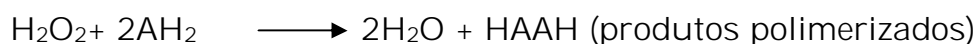
A peroxidase catalisa processos de polimerização, dos quais resultam oligómeros, estes podem ser removidos por diversos processos tais como, filtração, precipitação ou adsorção, devido ao elevado peso molecular e baixa solubilidade^[13,14]. Este processo de polimerização produz polímeros e dois radicais livres por cada molécula de peróxido de hidrogénio, como mostra a seguinte reacção química[10]:



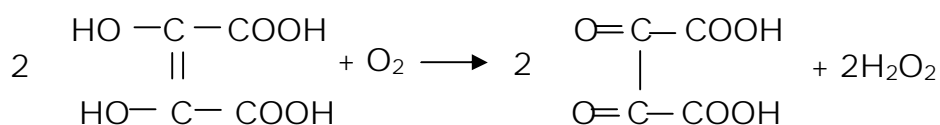
Onde AH_2 e AH^\bullet representam o substrato reduzido e o produto radical, respectivamente. Os substratos incluem fenóis aromáticos, ácidos fenólicos, indóis, aminas e sulfanatos. Os radicais livres (AH^\bullet) são muito reactivos, formando dímeros, trímeros e oligómeros, promovendo deste modo a biotransformação[6,10].

A peroxidase catalisa quatro diferentes tipos de reacções, a peroxidativa, a oxidativa, a catalática e a de hidroxilação. Sendo as equações gerais as seguintes[8]:

Peroxidativa:



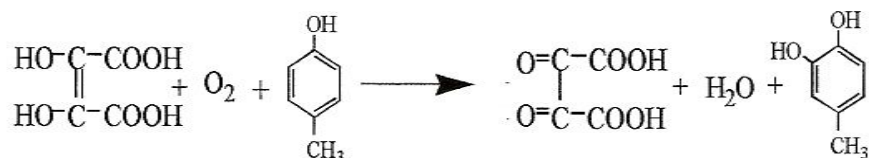
Oxidativa:



Catalática:



Hidroxilação:



A reacção peroxidativa é normalmente considerada a mais importante, onde diferentes compostos podem actuar como dadores de hidrogénio, incluindo fenóis e aminas aromáticas entre outros[8].

A reacção oxidativa pode ocorrer na ausência do peróxido de hidrogénio, no entanto, necessita da presença de oxigénio e cofactores (manganês e fenol). A hidroquinona, o ácido dihidroxifumárico e o ácido ascórbico, são os substratos possíveis de serem tratados neste tipo de reacção[8].

Diversas isoenzimas, provenientes de diferentes fontes têm diferentes razões de actividade peroxidativa/oxidativa, visto que têm

diferentes respostas em relação aos inibidores, o que implica que os locais activos separados são responsabilizados por ambas as acções catalíticas[8].

A reacção catalática é caracterizada pela ausência de substrato dador de hidrogénio, obrigando assim a peroxidase a funcionar como catalase, catalisando a decomposição do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, esta reacção é pelo menos 1000 vezes mais lenta que as reacções anteriores[8].

A reacção de hidroxilação produz derivados do catecol a partir de derivados do fenol e oxigénio, sendo necessário para tal um dador de hidrogénio. A peroxidase hidroxila vários composto aromáticos, entre eles temos a tirosina, a fenilalanina, o *p*-cresol e os ácidos benzóicos e salicílico.

1.4.6- Ciclo Catalítico

Durante a oxidação de substratos fenólicos, ocorrem importantes reacções, descritas no ciclo catalítico (Figura 5) que se inicia, com a decomposição do peróxido de hidrogénio em água, oxidando assim o ferro III (Fe^{3+}) a ferro IV (Fe^{4+}), originando o composto I. Este composto I é reduzido, devido à cedência de um electrão por parte do substrato, formando o composto II. Por fim o composto II regressa à forma nativa e normalmente ocorre a formação de uma molécula de água.[2,3,15].

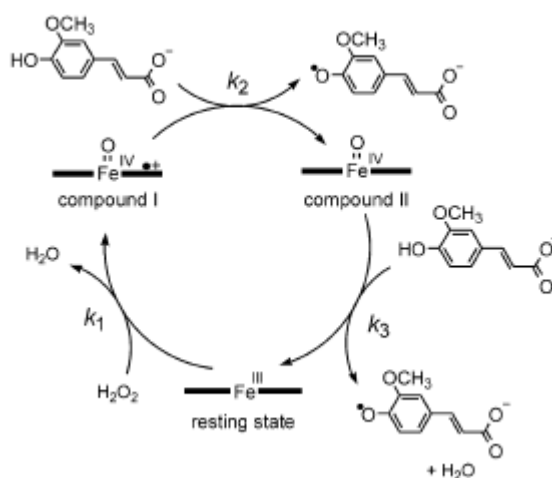


Figura 5: Representação do ciclo catalítico da peroxidase, onde as constantes k_1 , k_2 e k_3 representam a taxa de formação do composto I, taxa de redução do composto I e taxa de redução do composto II, respectivamente[2].

2-Alta Pressão Hidrostática

2.1- Introdução

A alta pressão foi aplicada durante bastantes anos na produção de diversos compostos, tais como, cerâmicas, diamante artificial e plásticos[16].

Ao nível das indústrias alimentares esta tecnologia é relativamente nova, mas teve um impacto positivo, já que a procura de alimentos minimamente processados, livres de aditivos e estáveis no armazenamento, tem tido uma procura crescente por parte dos consumidores. Esta tecnologia surge como alternativa aos métodos de preservação tradicionais, como é o caso do processamento térmico. Estes métodos provocam alterações indesejáveis ao produto, tais como, modificação de cor, sabor e perdas funcionais ou nutritivas. Sendo esta uma tecnologia não térmica, que inactiva enzimas e microrganismos presentes nos alimentos, provocando apenas alterações mínimas na qualidade nutricional e sensorial, preservando as propriedades naturais dos alimentos, como vitaminas ou aroma. Esta tecnologia pode ser aplicada com ou sem combinação de altas temperaturas, possibilitando a sua utilização em alimentos termo sensíveis[5,16-19].

Esta tecnologia consiste na aplicação de diferentes pressões (acima dos 100MPa), sendo eficiente na destruição de células vegetativas, incluindo bolores e leveduras, e quando combinada com temperatura, pode levar à destruição de esporos[16,17].

A pressão hidrostática é gerada por compressão de água, usando bombas e intensificadores de pressão. O alimento é deixado sob o efeito da pressão o tempo considerado necessário para garantir a segurança microbiológica[18].

2.2- Efeito das altas pressões nas proteínas

Os efeitos da pressão sobre proteínas já foram estudados ao longo dos anos, no entanto esta tecnologia só teve interesse significativo nos finais de 1980[20].

As propriedades funcionais das proteínas dos alimentos, podem-se agrupar em três grandes grupos[20]:

- Propriedades de hidratação: dependente da interacção proteína-água;
- Propriedades relacionadas com a interacção proteína-proteína (precipitação e gelificação);
- Propriedades da superfície (tensão superficial, emulsificação e características da espuma).

As altas pressões podem afectar as proteínas ao nível da conformação, pode levar à desnaturação destas, bem como à gelificação ou agregação, dependendo do tipo de proteína, pH, força iónica e da pressão e temperatura, bem como o tempo de duração do tratamento de pressurização[20].

Ao contrário dos tratamentos térmicos, que afectam quer as ligações covalentes quer as não-covalentes, os tratamentos por alta pressão à temperatura ambiente só afectam as ligações relativamente fracas (pontes de hidrogénio, ligações hidrofóbicas e ligações iónicas). Isto pode resultar na obtenção de características de qualidade importantes, como por exemplo, a cor original[16,17,20].

Diferentes tipos de interacções, contribuem para a estabilização da estrutura de proteínas distintas, secundária, terciária e quaternária (Tabela 2).

Tabela 2: Propriedades da estabilização de interações nas diversas estruturas das proteínas.[20]

Tipo de interações	Energia (kJ.mol ⁻¹)	Distância interação (Å)	Grupos funcionais envolvidos	Circunstâncias de desestabilização	Circunstâncias de estabilização
Covalentes e semi-covalentes	330-400 (Ligações peptídicas) 200(Ligações S-S)	1-2	-NH-CO- Cistina S-S	Agentes de redução	Aumento de reactividade dos grupos SH acima do pH 7
Electrostáticas	42-84	2-3	Resíduo de aminoácido com carboxilo e grupos amino	Soluções de sal, valores de pH baixos ou elevados, pressão	
Ligações de hidrogénio	8-40	2-3	Átomo de H do grupo OH ou NH compartilhado com o grupo CO, por exemplo	Soluções com Guanidina HCl, Ureia ou detergente, aquecimento	Arrefecimento
Hidrofóbicas	4-12	3-5	Resíduos de aminoácidos com cadeias laterais alifáticas ou aromáticas	Detergentes, pressão(cadeias laterais alifáticas), aquecimento a altas temperaturas	Aquecimento moderado, pressão (empilhamento de cadeias laterais aromáticas)
Van der Waals	1-9		Dipolos permanentes, induzidos e instantâneos		

A pressão afecta as diferentes estruturas, a estrutura secundária sofre uma conformação irreversível, a estrutura terciária é afectada através de uma conformação reversível e por fim a estrutura quaternária é afectada através de interações hidrofóbicas[18,20,21].

À temperatura ambiente, as mudanças provocadas pela pressão nas proteínas e enzimas são geralmente reversíveis para uma gama de pressão que varia entre 100 e 300 MPa, no entanto para pressões acima dos 400 MPa essas mudanças tornam-se irreversíveis. A pressão também favorece a dissociação de proteínas oligoméricas, assim como o desnovelamento de cadeias de proteínas[18,22].

A respeito das alterações no volume conformacional, as ligações covalentes são pouco afectados pela alta pressão, pelo menos a baixas temperaturas e, conseqüentemente a estrutura primária das proteínas permanece intacta durante o tratamento a altas pressões. Contudo, quando expostas a pressões elevadas ocorre mudanças na estrutura secundária, levando a uma desnaturação irreversível. Isto pode ser explicado pelo facto das pontes de hidrogénio, ligações responsáveis

pela estrutura secundária (helicoidal), serem favorecidas a baixas pressões e serem destruídas a pressões elevadas. A ruptura das ligações iónicas também é afectada a altas pressões. O efeito da pressão sob as interacções hidrofóbicas é mais complexo, havendo estudos que apontam para efeitos de estabilização e outros de desestabilização. Alterações na estrutura terciária ocorrem para pressões acima dos 200 MPa uma vez que as ligações iónicas e interacções hidrofóbicas que a mantém são afectadas pelo aumento da pressão. Quanto à estrutura quaternária, esta é mantida por ligações não-covalentes, sendo afectada a pressões relativamente baixas, aproximadamente 150 MPa[17,23].

As enzimas são um tipo de proteínas, cuja actividade biológica se deve ao centro activo, originado pela configuração tridimensional da molécula. O desnovelamento de uma enzima pode causar mudanças conformacionais, que podem até alterar a funcionalidade, resultando num aumento ou diminuição da actividade biológica da mesma, como até pode causar mudanças na especificidade do substrato[17,18].

Relativamente às pressões de inactivação, parece existir um patamar abaixo do qual não ocorre inactivação enzimática. Quando a pressão excede este patamar, a inactivação enzimática aumenta, até um certo valor de pressão. Este intervalo de pressões em que ocorre inactivação é fortemente influenciado pelo pH, concentração de substrato, estrutura das subunidades da enzima e temperatura usada durante o processo de pressurização. Para algumas enzimas, como o caso da tripsina, em que parece haver um máximo de pressão, não interessa ultrapassar essa mesma pressão que não leva a uma inactivação adicional[17,24].

Existem dados que sugerem que os ciclos de pressurização são mais eficientes, quer a nível energético, quer a nível da inactivação enzimática por alta pressão. Visto que sucessivas aplicações de alta pressão são mais eficazes na inactivação de algumas enzimas (tripsina, pepsina, etc), pois a actividade das enzimas sujeitas a ciclos é inferior à actividade das enzimas que sofrem a pressurização de uma só vez com o mesmo tempo final[17].

2.3- Princípios da alta pressão

Nos processos de alta pressão, as amostras são submetidas a altas pressões, este tratamento requer um fluido de compressão, que actue como meio de transferência de pressão para o produto. No caso de alimentos, geralmente esse fluido é água, então o processo adquire a designação de alta pressão hidrostática.

Os efeitos da alta pressão são devidos a dois princípios, princípio de *Le Chatelier* e princípio Isostático[16].

- Princípio de *Le Chatelier*: afirma que qualquer fenómeno (mudança de fase, mudança de conformação molecular ou reacção química), que envolve uma redução/aumento de volume é influenciado pela pressão. São favorecidas as reacções que impliquem uma diminuição do volume e retardadas as reacções em que o volume aumenta.
- Princípio Isostático: a pressão exercida transmite-se de uma forma uniforme e instantânea através do material biológico, independentemente da sua forma, tamanho e composição.

Neste processo, a amostra é protegida do fluido envolvente por um material flexível e selado, sendo a pressão criada por uma bomba e o líquido pressurizado mantido num cilindro de aço.

2.4- Efeito da Alta Pressão na Peroxidase

Como foi referido anteriormente, o tratamento por altas pressões pode provocar alterações nas enzimas de diversos modos, aumentando/diminuindo a sua actividade ou mesmo causando a sua desnaturação.

A peroxidase causa mudanças adversas, no sabor, textura e cor durante o armazenamento de produtos hortícolas. Esta é tida como uma das enzimas mais estáveis à pressão[5,25,26].

Estudos realizados com cenoura, mostram que a completa inactivação da peroxidase ocorre após tratamento com pressões de 900 MPa. Já no caso do tomate a pressão necessária para inactivar a peroxidase é de 600 MPa[25,27].

O estudo da actividade da peroxidase em *Rubus Ideaeus* e *Fragaria x ananassa*, mostra que para uma pressão de 400 MPa durante 5 e 10 minutos, há um acréscimo de 13% e 1% na actividade da peroxidase, respectivamente. Quando esse tempo de pressurização é de 15 minutos, ocorre uma redução na actividade de 5%. Este mesmo estudo comprova que, uma gama de pressões de 600-800 MPa é a mais eficiente para a inactivação da enzima[28].

Pimentos tratados a alta pressão, mostram uma redução na actividade da peroxidase em cerca de 70% e 40%, para pimentos verdes e vermelhos, respectivamente. Feijão verde tratado a uma pressão de 900 MPa, durante 10 minutos à temperatura ambiente, mostra uma inactivação da POD de 88%. A peroxidase do feijão verde, mostra uma actividade residual de 75%, quando tratada a 500 MPa durante 60 segundos à temperatura ambiente[17,24,27].

Puré de morango e sumo de laranja, não necessitam de tratamentos de pressão tão drásticos para inactivar a peroxidase, pois bastam 300 e 400 MPa à temperatura ambiente[27].

A actividade da peroxidase da laranja à temperatura ambiente, durante 15 minutos, diminui continuamente até 400 MPa. A maior taxa de inactivação (50%) foi encontrada para 32°C. No sumo de laranja a

actividade da peroxidase, aumenta com os tratamentos de alta pressão para as temperaturas de 32 e 60°C[17].

Uma pressão de 400 MPa causa uma activação da peroxidase do morango, de 13% e 1% para 5 e 10 minutos, respectivamente[23,29].

Em sumo de kiwi sujeito a pressões de 600 MPa, a uma temperatura de 50°C durante 30 minutos, a peroxidase não inactiva. Comparando os dados obtidos de inactivações para diferentes soluções de peroxidase, parcialmente puras, à mesma temperatura, conclui-se que para 30°C o valor da actividade residual diminui ligeiramente, no entanto esta diferença não é significativa[19].

A peroxidase da cenoura diminui 16% nos primeiros 30 minutos de exposição a um tratamento de 350 MPa a 20°C, seguidamente ao fim de 60 minutos diminui mais 9%. Para pressões até 600 MPa à temperatura de 25 e 35°C, a actividade da peroxidase da cenoura não mostra reduções significativas. No entanto, para 600 MPa a 25°C, durante 15 minutos, ocorre uma inactivação de 55% da peroxidase e para 45°C a inactivação é de 91% [23].

Para o feijão verde, verifica-se um aumento da actividade da peroxidase de 55% para 84%, isto a uma pressão de 350 MPa e a 50°C, após um tempo de exposição de 30 minutos para 60 minutos. Este aumento é justificado pelas variações conformacionais que ocorrem na enzima[23].

Estas diferenças no comportamento, podem ser devidas a diversos factores, como por exemplo, o pH, o substrato e a temperatura a que decorrem as determinações. Além disso, sabe-se que a actividade da peroxidase está associada a diferentes isoenzimas, estas têm diferentes resistências ao calor e reagem de diferentes formas quando expostas à pressão, consoante a sua origem.

O estudo da peroxidase constitui uma importante contribuição, para uma melhor compreensão do seu comportamento em frutos e vegetais. O conhecimento aprofundado sobre a peroxidase é importante para produzir frutos e vegetais frescos, congelados, enlatados ou

lioofilizados de elevada qualidade, sendo que a peroxidase está relacionada com a qualidade dos alimentos[8].

Activar ou inactivar a peroxidase recorrendo à alta pressão, tem grande aplicabilidade, daí surge o interesse deste caso de estudo, que tem como objectivo verificar o comportamento da enzima peroxidase (POD) em condições extremas.

A inactivação desta enzima é uma das preocupações primordiais na tecnologia alimentar, tendo como objectivo a conservação de alimentos (especialmente frutos, vegetais e alimentos termosensíveis). Além disto, a activação da enzima também constitui um motivo de interesse, pois a sua ampla utilização na indústria, poderia ser rentabilizada.

Da pesquisa bibliográfica feita não se encontram trabalhos envolvendo o efeito de altas pressões na actividade da peroxidase, mas apenas estudos de inactivação da enzima com pressão.

Parte II. Método Experimental

1-Reagentes

Foi usada a peroxidase do tipo II P8250 (R.Z.=1,9) da Sigma. O fenol da Merck, peróxido de hidrogénio (30%(P/V)) da Panreac Química SA, Tris-(hidroximetil)-aminometano e ácido clorídrico (37%) da Riedel-de Haën, 4-aminoantipirina e catalase (C9322, 2950 U/mg de sólido) da Sigma.

2-Determinação da Actividade da Peroxidase

Para estudar a actividade da peroxidase, quando submetida a altas pressões, e assegurar a comparação com a actividade determinada à pressão atmosférica, tornou-se essencial, garantir que as determinações eram feitas nas mesmas condições, quando submetidas a pressões diferentes. Assim sendo, todo o procedimento experimental, foi otimizado inicialmente de modo a que a reacção se mantivesse na zona linear da curva de absorvância em função do tempo, durante aproximadamente 30 minutos.

Para a determinação da actividade da peroxidase foi utilizado o método espectrofotométrico, com base no procedimento de Worthington (1993).[6] Este método baseia-se na quantificação de um produto cromóforo, formado devido à oxidação do substrato, pela enzima peroxidase. Neste caso o cromóforo quantificado foi a antipirilquinonimina. O substrato usado era composto por 1.033 mL de peróxido de hidrogénio (9.11×10^{-4} M), 5 mL fenol (0.16 M) e 4-aminoantipirina (2.3mM) em 3.970 ml de tampão Tris-HCl (pH 7.5), perfazendo um volume de 10 mL. A 1450 μ L de meio reaccional, previamente equilibrado a 30°C, durante aproximadamente 10 minutos, foram adicionados diferentes volumes de enzima peroxidase a partir de

uma mesma concentração ($2,00 \times 10^{-3}$ mg/mL), de modo a prefazer um volume final de 1500 μ L.

O tampão Tris-HCl foi escolhido pela sua estabilidade, quando submetido a altas pressões, mantendo estável o pH do meio reaccional em estudo. A quantidade de 4-aminoantipirina (2.3 mM), manteve-se constante em todos os ensaios, tanto para as soluções de fenol de diferentes concentrações como para as soluções em que se variou a concentração do peróxido de hidrogénio, ou seja, a todos os substratos foram adicionadas 0.04674 g de 4- aminoantipirina.

A reacção foi levada a cabo, testando a enzima numa concentração de 6.67×10^{-4} mg/mL, em alíquotas de 33 μ L. A variação de absorvância foi determinada a 510 nm, utilizando um espectrofotómetro PerkinElmer UV/ Visível.

Determinou-se a actividade da POD calculando a velocidade inicial da reacção de catálise, determinada pelo declive da zona linear da curva de absorvância em função do tempo. A partir dos valores do declive, calculou-se a respectiva actividade, em unidades de Abs 510 nm.min⁻¹. Converteu-se esta actividade, através da Lei de Beer-Lambert, cujo valor de ϵ é conhecido ($6.58 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)[6], em unidades SI de μ mol.min⁻¹.

Estabeleceu-se como tempo de reacção 20 minutos, para todos os ensaios realizados com a enzima. Para isso, tornou-se necessário um método, que assegurasse que a reacção era parada ao fim de 20 minutos. Para parar a reacção foi usada a enzima catalase (50 μ L) que quando adicionada ao meio reaccional consome todo o peróxido de hidrogénio ainda existente no meio, parando assim a reacção em estudo. Pretende-se que esta paragem seja praticamente imediata, e para isso tornou-se necessário estudar uma concentração de catalase específica, para esse efeito. Este tempo predefinido foi necessário, visto que submeter o sistema reaccional à pressão, não permitiria que a actividade fosse medida ao longo do tempo de reacção. Assim para tornar possível comparações entre os resultados à pressão atmosférica e

sob alta pressão, todas as actividades foram medidas ao fim de 20 minutos de reacção.

3-Determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten

Determinaram-se os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_M e $V_{m\acute{a}x}$, fazendo variar a concentração de peróxido de hidrogénio e fenol presentes no substrato.

Inicialmente, determinou-se o K_M e o $V_{m\acute{a}x}$ relativos ao peróxido de hidrogénio, fazendo variar a concentração deste no substrato e mantendo na saturação a concentração de fenol. Mediu-se a actividade do modo descrito em 2, a única alteração consiste na concentração da solução de peróxido de hidrogénio a usar para o substrato. Usaram-se concentrações de peróxido de hidrogénio de 4.56×10^{-2} ; 1.37×10^{-1} ; 2.28×10^{-1} ; 4.56×10^{-1} ; 6.84×10^{-1} ; 7.75×10^{-1} ; 9.11×10^{-1} ; 1.14 e 1.37 mM.

Do mesmo modo, determinaram-se as referidas constantes relativas ao fenol, fazendo variar a concentração deste e mantendo na saturação a concentração de peróxido de hidrogénio. Foram usadas concentrações de fenol na ordem de 4; 8; 24; 40; 80; 120; 136; 160; 200 e 240 mM.

Para os dois substratos, foram calculadas as constantes cinéticas com recurso ao modelo linear de Lineweaver-Burk e comparadas com as obtidas pelo modelo não linear de Michaelis-Menten, determinadas recorrendo a ferramentas do programa MATLAB.

4- Estudo da estabilidade da enzima peroxidase a diferentes pressões

Com o objectivo de avaliar a estabilidade da enzima quando sujeita a alta pressão, submeteu-se a enzima peroxidase em tampão Tris-HCl (pH 7.5) a alta pressão, durante 10 minutos, o mesmo tempo que a enzima está sob pressão aquando da determinação da actividade, e deixou-se à pressão atmosférica enzima nas mesmas condições durante o mesmo tempo. Posteriormente, a actividade da enzima foi determinada fazendo reagir 33,0 μL de cada uma das soluções de enzima (submetida ou não a pressão) com 1000 μL de substrato, medindo a absorvância a 510 nm ao longo do tempo. Determinaram-se as respectivas actividades ($\text{Abs } 510 \text{ nm min}^{-1}$), através do declive da recta conseguida na zona linear de absorvância em função do tempo de reacção. Utilizou-se como equipamento de alta pressão, a prensa da Unipress Equipment (Figura 6).



Figura 6: Representação do equipamento de alta pressão.

5- Estudo da actividade da enzima peroxidase a diferentes temperaturas

Com o objectivo de estudar a actividade da enzima quando sujeita a diferentes temperaturas, colocou-se 82,5 μL de enzima peroxidase em 2500 μL de meio reaccional previamente equilibrado a temperaturas de 10, 20, 30, 40 e 50 (± 0.1) $^{\circ}\text{C}$. A esse meio reaccional foram retiradas alíquotas de 200 μL , onde se adicionou 20 μL de catalase para parar a reacção a diferentes tempos, juntou-se 800 μL de tampão Tris-HCl (pH 7.5) para perfazer um volume mensurável de ser medido no espectrofotómetro PerkinElmer UV/ Visível.

O objectivo deste estudo, era estudar o efeito da alta pressão na enzima peroxidase, às temperaturas referidas anteriormente, o que não foi possível, devido a uma avaria do equipamento de alta pressão.

6- Estudo do efeito da alta pressão nas constantes cinéticas

A fim de avaliar o efeito da pressão na actividade da enzima, nomeadamente nas constantes cinéticas de Michaelis-Menten, relativas ao fenol e ao peróxido de hidrogénio, o sistema reaccional foi submetido a pressões diferentes (100, 200, 350 e 500 MPa).

Para que esta comparação fosse possível, para cada ensaio submetido à pressão, foi feito em simultâneo, um à pressão atmosférica, cada um deles em duplicado. Este procedimento permitiu a eliminação de possíveis erros causados por diferentes condições ambientais, erros inerentes à preparação das soluções constituintes do substrato, assim como erros humanos. A determinação da actividade foi feita do modo descrito anteriormente em 2 e 3, variou-se apenas a pressão a que o sistema reaccional foi submetido. A reacção foi iniciada à pressão atmosférica permanecendo a esta pressão durante 5 minutos, foi então submetida a alta pressão onde permaneceu durante 10 minutos. Após este tempo, o sistema reaccional voltou à pressão atmosférica, onde

permaneceu à mesma temperatura, até a reacção ser parada com catalase (20 μL), ao fim de um tempo total de 20 minutos. É importante referir que o volume total do meio reaccional não foi o mesmo usado para as determinações dos parâmetros cinéticos iniciais à pressão atmosférica, devido a limitações do vaso de pressurização. Foram usados eppendorfs de 400 μL , dos quais foram retirados 200 μL para as determinações (em duplicado). Para a posterior comparação de resultados, foi tido em conta este facto, e os resultados foram convertidos pelos respectivos factores de diluição daqui inerentes.

É importante referir que a temperatura usada nos estudos sob pressão descritos neste trabalho foi de 30 e 20°C, com excepção das várias concentrações de fenol que só foram realizadas para 30°C.

Parte III. Resultados e Discussão

1-Variação da actividade da peroxidase com a sua concentração

Estudaram-se diferentes concentrações de enzima peroxidase, com a finalidade de obter a concentração adequada para o estudo em causa. A partir de uma mesma solução de enzima (2×10^{-3} mg/mL), foram retiradas diferentes alíquotas, nomeadamente 4.2 μ L, 10 μ L, 16 μ L, 20 μ L e 26,6 μ L, acertando com tampão Tris-HCl (pH 7.5) o restante volume até perfazer 50 μ L, sendo os restantes 1450 μ L constituídos pela solução de substrato (fenol, 4-aminoantipirina e peróxido de hidrogénio), perfazendo assim um volume reaccional final de 1500 μ L.

Efectuaram-se vários testes (no mínimo em duplicado), com diferentes concentrações de enzima peroxidase, de modo a se encontrar a concentração adequada ao estudo, sendo esta de $2,13 \times 10^{-5}$ mg/mL (Gráfico 1). Todos os testes foram realizados nas mesmas condições experimentais.

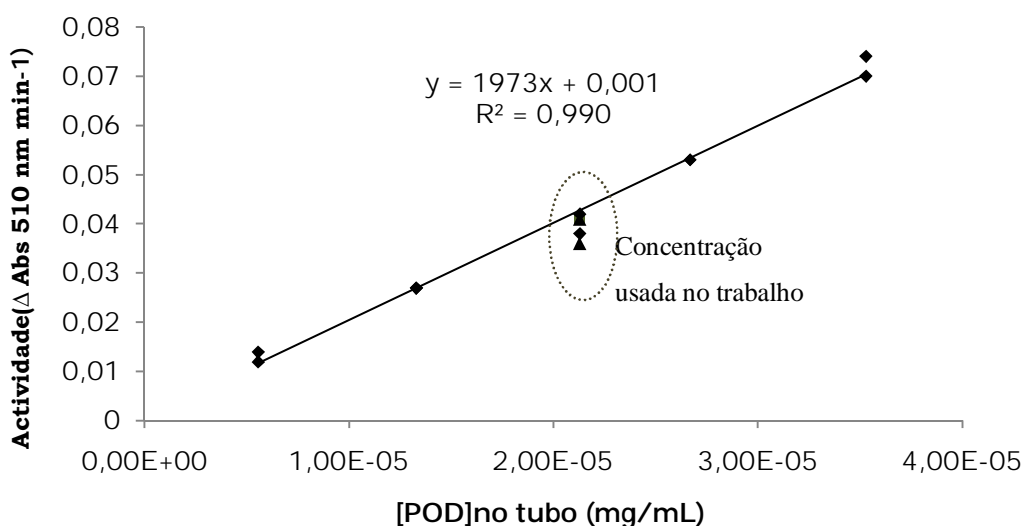


Gráfico 1: Variação da actividade da peroxidase, em função da concentração de enzima presente no meio reaccional.

2- Cinéticas de Reacção da Enzima Peroxidase (POD) à Pressão Atmosférica

2.1- Determinação das Constantes Cinéticas de Michaelis-Menten à Pressão Atmosférica

Michaelis e Menten propuseram o esquema que se segue para o processo de catálise enzimática[1]:



Onde as letras E, S e P correspondem à enzima, substrato e produto, respectivamente. O modelo de Michaelis-Menten baseia-se nos seguintes pressupostos: estudando apenas o período inicial da reacção, a concentração de produto pode ser desprezada, ignorando desta forma a reacção inversa, ou seja, a formação do complexo ES. A formação deste complexo é instantânea, não sendo acompanhada por modificações químicas, a enzima e o substrato estão ligados por forças de natureza física. Por último, a dissociação do complexo ES em produto e enzima livre considera-se ser mais lenta que a formação deste complexo.[1] Surge então a Equação de Michaelis-Menten:

$$v_0 = (v_{\text{máx}} [S]) / (K_M + [S])$$

Onde K_M é igual à constante de dissociação do complexo enzima-substrato e $V_{\text{máx}}$, a velocidade máxima.

Para a determinação dos parâmetros K_M e $V_{m\acute{a}x}$ é usual transformar a equação de Michaelis-Menten, numa equação linear, permitindo assim a análise gráfica dos resultados, bem como os possíveis desvios ao comportamento descrito pelo modelo de Michaelis-Menten, obtendo-se a equação de Lineweaver-Burk[1]:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Os resultados obtidos a diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para 30°C e 20°C, são apresentados nas Tabela 3 e 7 e Gráfico 2 e 5, respectivamente. A mesma determinação foi feita para o caso de diferentes concentrações de fenol, mas só a 30°C (Tabela 11, Gráfico 8).

Tabela 3: Valores da actividade da peroxidase em função da concentração de peróxido de hidrogénio, para a pressão atmosférica a 30°C.

Actividade (μmol/min)	[H ₂ O ₂] (mM)
2,016	4,56E-02
3,487	1,37E-01
5,820	2,28E-01
8,372	4,56E-01
9,133	6,83E-01
10,06	9,11E-01
10,12	1,37E+00

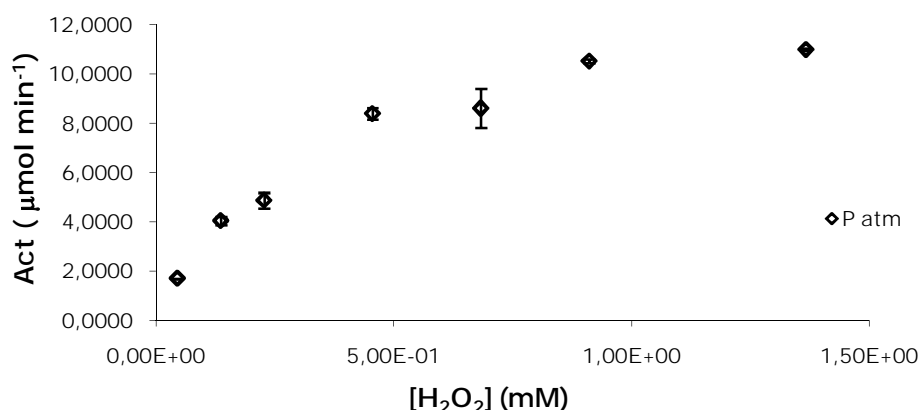


Gráfico 2: Representação da actividade da enzima peroxidase, em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, à pressão atmosférica a 30°C. As barras de erro verticais representam o desvio padrão (DP) (duas determinações).

De modo a obter as constantes cinéticas pelo modelo linear de Lineweaver-Burk, recorreu-se à inversão directa da actividade e da concentração (Tabela 4 e Tabela 8). Através da representação gráfica destes parâmetros (Gráfico 3 e Gráfico 6), calculou-se as respectivas constantes cinéticas.

Tabela 4: Valores do inverso da actividade da peroxidase em função do inverso da concentração do peróxido de hidrogénio, para a pressão atmosférica a 30°C.

1/Actividade (μmol/min) ⁻¹	1/[H ₂ O ₂] (mM) ⁻¹
0,496	2,20E+01
0,287	7,32E+00
0,172	4,39E+00
0,119	2,20E+00
0,109	1,46E+00
0,099	1,10E+00
0,099	7,32E-01

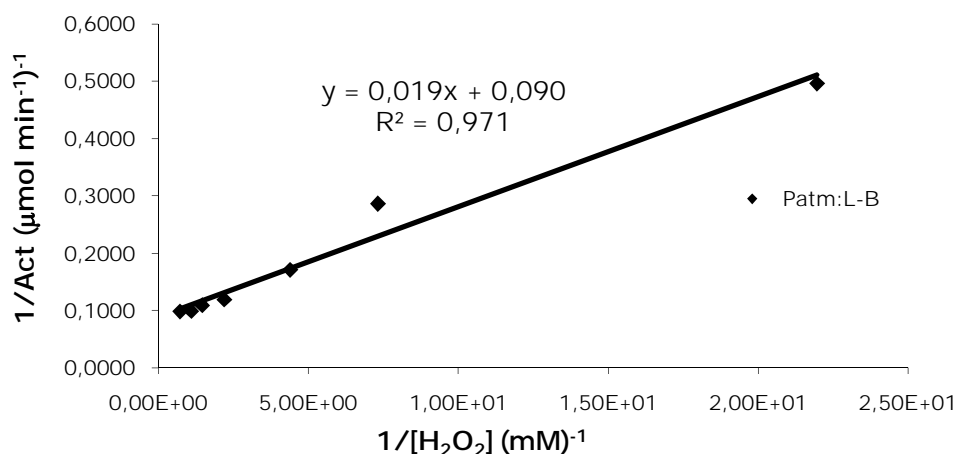


Gráfico 3: Representação dos resultados segundo o modelo linear de Lineweaver-Burk (L-B). Inverso da actividade da peroxidase em função do inverso da concentração de peróxido de hidrogénio, à pressão atmosférica a 30°C.

Tabela 5: Valores das constantes cinéticas, calculadas com base no modelo de Lineweaver-Burk, para a pressão atmosférica a 30°C.

$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_M (mM)
11,22	0,217

Para comparação, calculou-se por regressão não linear pelo modelo de Michaelis-Menten (Gráfico 4), K_M e $V_{\text{máx}}$ (Tabela 6).

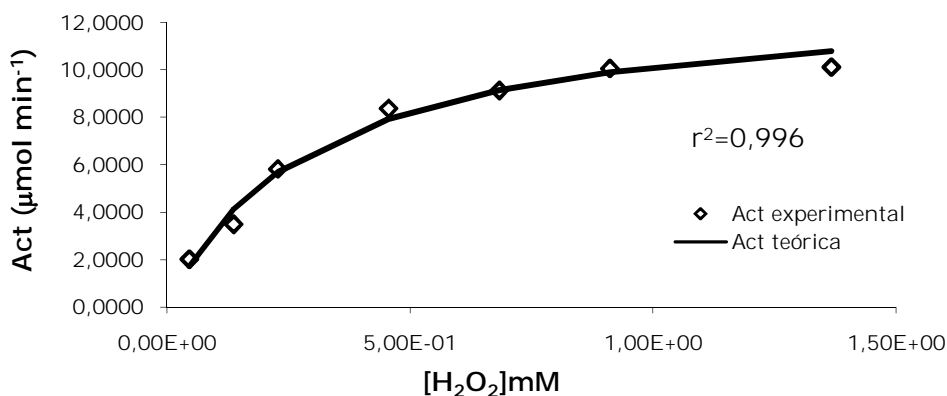


Gráfico 4: Representação gráfica da actividade experimental, obtida variando a concentração de peróxido de hidrogénio no substrato à pressão atmosférica, a 30°C, e da actividade teórica obtida a partir dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %).

Tabela 6: Valores das constantes cinéticas, obtidas pelo modelo não linear de Michaelis-Menten, para a pressão atmosférica a 30°C e respectivo intervalo de variação a 95% de confiança.

$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol/min}$)	K_M (mM)
13,14(12,11 - 14,18)	0,299 (0,231 - 0,367)

Os valores obtidos pelo modelo linear foram: $K_M=0,217$ mM e $V_{\text{máx}}=11,22 \mu\text{mol min}^{-1}$ (Tabela 5). Para o modelo não linear, através da aproximação pela equação de Michaelis-Menten foram obtidos: $K_M=0,299$ mM e $V_{\text{máx}}=13,14 \mu\text{mol min}^{-1}$ (Tabela 6).

Seguindo a mesma metodologia, determinou-se as constantes cinéticas em relação ao peróxido de hidrogénio, a 20°C, mantendo na saturação a concentração de fenol e 4-AAP.

Tabela 7: Valores da actividade da peroxidase em função da concentração de peróxido de hidrogénio, para a pressão atmosférica a 20°C.

$[\text{H}_2\text{O}_2](\text{mM})$	Actividade($\mu\text{mol/min}$)
4,56E-02	1,124
1,37E-01	1,802
2,28E-01	3,450
4,56E-01	4,304
6,83E-01	5,304
9,11E-01	5,393
1,37E+00	4,951

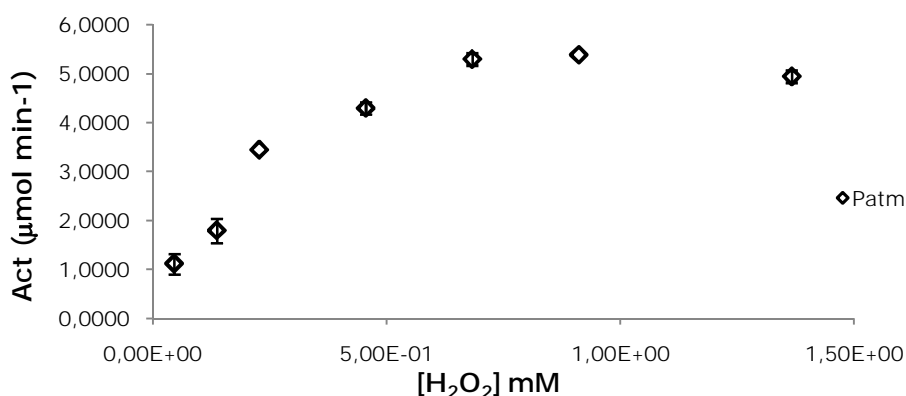


Gráfico 5: Representação da actividade da enzima peroxidase, em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, à pressão atmosférica a 20°C. As barras de erro verticais representam o desvio padrão (DP) (duas determinações).

Tabela 8: Valores do inverso da actividade da peroxidase em função do inverso da concentração do peróxido de hidrogénio, para a pressão atmosférica a 20°C.

$1/[H_2O_2] \text{ (mM)}^{-1}$	$1/\text{Actividade (}\mu\text{mol/min)}^{-1}$
2,20E+01	0,889
4,39E+00	0,290
2,20E+00	0,232
1,46E+00	0,189
1,10E+00	0,185
7,32E-01	0,202

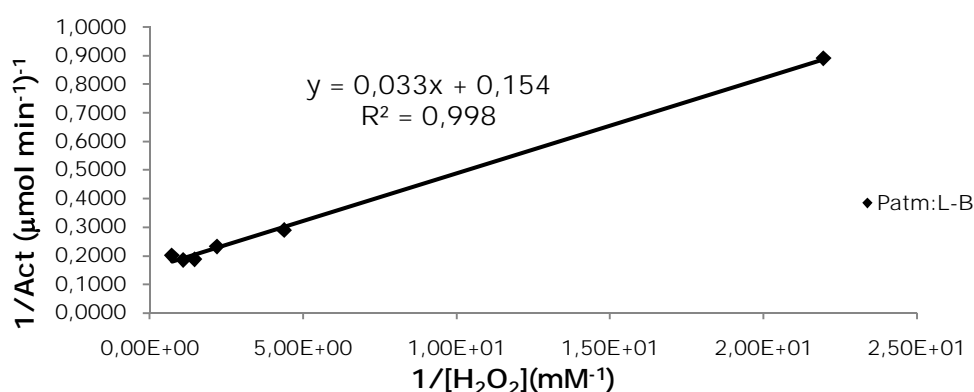


Gráfico 6: Representação dos resultados segundo o modelo linear de Lineweaver-Burk. Inverso da actividade da peroxidase em função do inverso da concentração de peróxido de hidrogénio, à pressão atmosférica a 20°C.

Tabela 9: Valores das constantes cinéticas, calculadas com base no modelo de Lineweaver-Burk, para a pressão atmosférica a 20°C.

$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_M (mM)
6,489	0,217

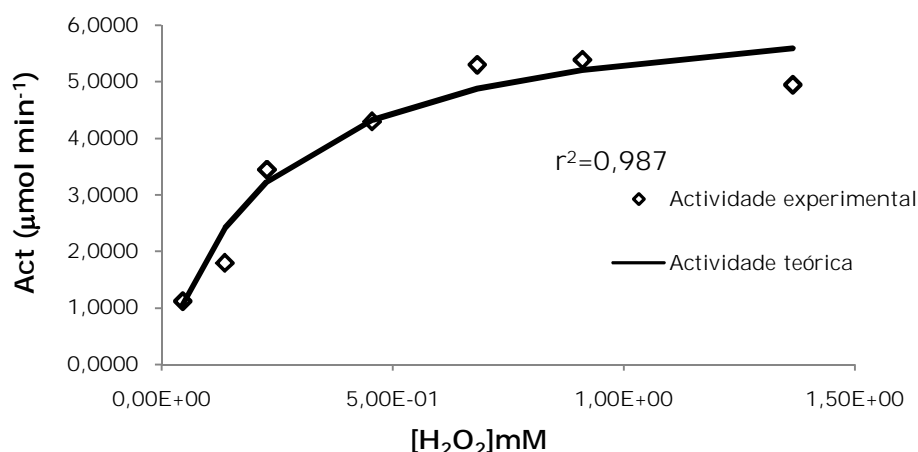


Gráfico 7: Representação gráfica da actividade experimental, obtida variando a concentração de peróxido de hidrogénio no substrato à pressão atmosférica, a 20°C, e da actividade teórica obtida a partir dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %).

Tabela 10: Valores das constantes cinéticas, obtidas pelo modelo não linear de Michaelis-Menten, para a pressão atmosférica a 20°C e respectivo intervalo de variação a 95% de confiança.

$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_M (mM)
6,462 (5,597 - 7,328)	0,233 (0,132 - 0,334)

Obteve-se pelo modelo linear uma velocidade máxima semelhante à que se visualiza pela representação gráfica (Gráfico 5, Gráfico 6, Tabela 7 e Tabela 8). Este valor foi confirmado através do modelo não linear, com recurso ao MATLAB (Gráfico 7). Os valores obtidos pelo método linear foram: $K_M=0,217$ mM e $V_{\text{máx}}=6,489$ $\mu\text{mol min}^{-1}$ (Tabela 9). Para o método não linear, através da aproximação pela equação de Michaelis-Menten

foram obtidos: $K_M=0,233$ mM e $V_{m\acute{a}x}=6,462$ $\mu\text{mol min}^{-1}$ (Tabela 10), os valores obtidos pelo método de linearização de Lineweaver-Burk encontram-se dentro do intervalo de confiança a 95% em comparação aos obtidos pelo método de Michaelis-Menten.

Comparando K_M e $V_{m\acute{a}x}$ para o peróxido de hidrogénio, a diferentes temperaturas, verificou-se a influência da temperatura nestas constantes cinéticas, ou seja, estas aumentam com a temperatura. Obteve-se pelo método não linear: $K_M=0,299$ mM, $V_{m\acute{a}x}= 13,14$ $\mu\text{mol min}^{-1}$ (Tabela 6) e $K_M=0,233$ mM, $V_{m\acute{a}x}=6,462$ $\mu\text{mol min}^{-1}$ (Tabela 10), para 30°C e 20°C, respectivamente.

Com base no mesmo procedimento, determinou-se as constantes cinéticas em relação ao fenol, fazendo variar a sua concentração no substrato, mantendo na saturação a concentração de peróxido de hidrogénio, a 30°C.

Tabela 11: Valores da actividade da peroxidase em função da concentração de fenol, para a pressão atmosférica a 30°C.

[fenol] (mM)	Actividade ($\mu\text{mol/min}$)
4,00E+00	2,356
8,00E+00	4,301
2,40E+01	6,434
4,00E+01	7,748
8,00E+01	8,333
1,20E+02	8,864
1,36E+02	9,929
1,60E+02	10,35
2,00E+02	10,08
2,40E+02	10,08

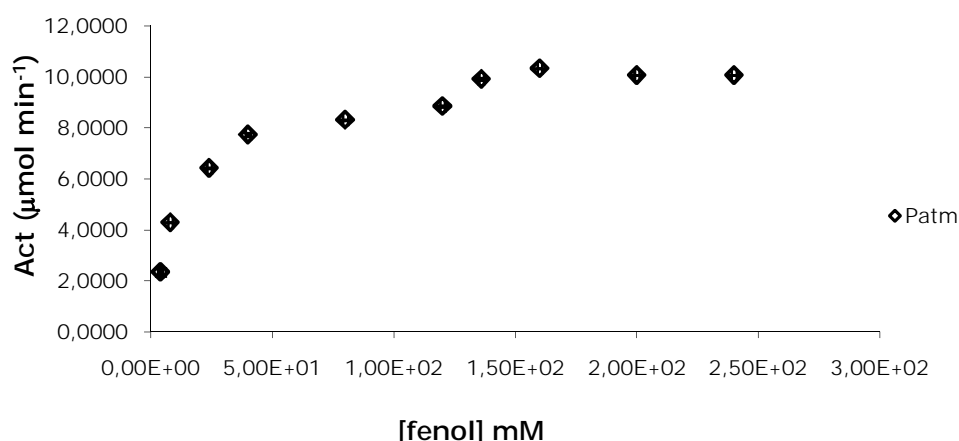


Gráfico 8: Representação da actividade da enzima peroxidase, em função das diferentes concentrações de fenol, à pressão atmosférica a 30°C. As barras de erro verticais representam o desvio padrão (DP) (duas determinações).

Recorrendo aos dois modelos, linear (Tabela 12, Gráfico 9) e não linear (Gráfico 10), obteve-se o valor das respectivas constantes cinéticas (Tabela 13, Tabela 14).

Tabela 12: Valores do inverso da actividade da peroxidase em função do inverso da concentração do fenol, para a pressão atmosférica a 30°C.

$1/[\text{fenol}] \text{ (mM)}^{-1}$	$1/\text{Actividade } (\mu\text{mol/min})^{-1}$
2,50E-01	4,24E-01
1,25E-01	2,33E-01
4,17E-02	1,55E-01
2,50E-02	1,29E-01
1,25E-02	1,20E-01
8,33E-03	1,13E-01
7,35E-03	1,01E-01
6,25E-03	9,66E-02
5,00E-03	9,92E-02
4,17E-03	9,92E-02

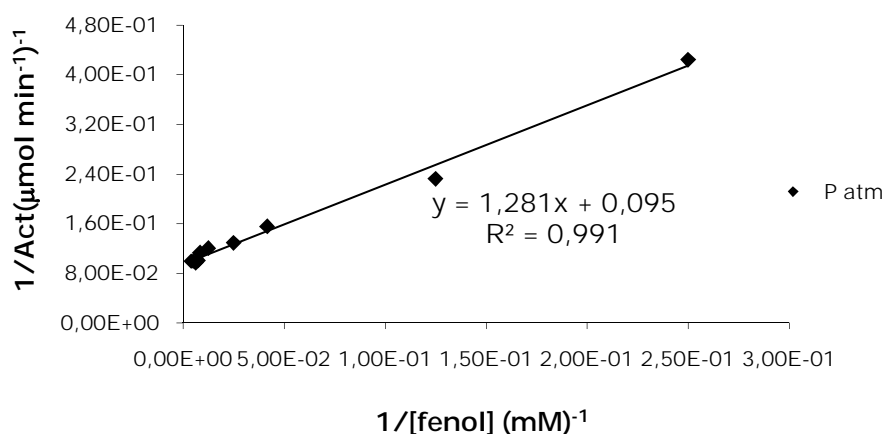


Gráfico 9: Representação dos resultados segundo o modelo linear de Lineweaver-Burk. Inverso da actividade da peroxidase em função do inverso da concentração de fenol, à pressão atmosférica a 30°C.

Tabela 13: Valores das constantes cinéticas, calculadas com base no modelo de Lineweaver-Burk, para a pressão atmosférica a 30°C.

$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol/min}$)	K_M (mM)
10,55	13,51

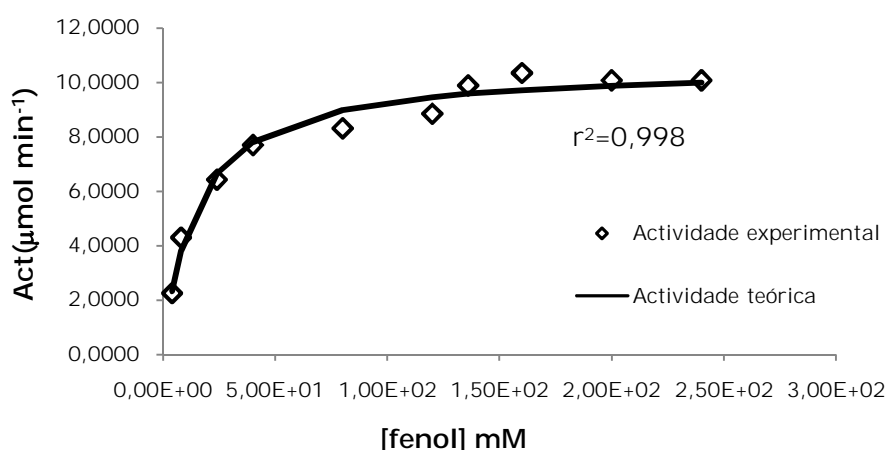


Gráfico 10: Representação gráfica da actividade experimental, obtida variando a concentração de fenol no substrato à pressão atmosférica, a 30°C, e da actividade teórica obtida a partir dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %).

Tabela 14: Valores das constantes cinéticas, obtidas pelo modelo não linear de Michaelis-Menten, para a pressão atmosférica a 30°C e respectivo intervalo de variação a 95% de confiança.

$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol/min}$)	K_M (mM)
10,60 (10,21 - 10,99)	14,23 (11,50 - 16,96)

Os valores obtidos pelo método linear foram: $K_M=13,51$ mM e $V_{\text{máx}}=10,55$ $\mu\text{mol min}^{-1}$ (Tabela 13). Para o método não linear, através da aproximação pela equação de Michaelis-Menten foram obtidos: $K_M=14,23$ mM e $V_{\text{máx}}=10,60$ $\mu\text{mol min}^{-1}$ (Tabela 14), os valores obtidos pelo método de linearização de Lineweaver-Burk encontram-se dentro do intervalo de confiança a 95% em comparação aos obtidos pelo método de Michaelis-Menten.

Comparando os valores de K_M obtidos para os diferentes substratos de fenol e peróxido de hidrogénio a 30°C, verifica-se que são bastante semelhantes com os registados na literatura. Obteve-se um K_M de 0.22 mM para o peróxido de hidrogénio, comparando este com o valor obtido por Dong[6], 0.43 mM, determinado para a HRP, os dois revelam-se próximos, o mesmo acontece com o valor de 0.53 mM referente à peroxidase da azeitona (*Olea europaea* L.).[6]

Relativamente ao fenol, o K_M obtido foi de 13.51 mM, este valor assemelha-se ao obtido por Liu, Song, 13 mM.[6]

Esta diferença entre valores de K_M , revela que aparentemente a enzima peroxidase, tem maior afinidade para o peróxido de hidrogénio, esta afinidade é confirmada na literatura. Contudo esta comparação não pode ser assim tão linear, uma vez que os dois substratos se ligam à enzima em estados diferentes de oxidação do ferro.

3-Efeito da Alta Pressão nas Constantes Cinéticas

3.1- Determinação das Constantes Cinéticas em Relação ao Fenol

Para a determinação das constantes cinéticas, foi necessário determinar a actividade da peroxidase em função das diferentes concentrações de fenol (Tabela 15 e Gráfico 11), a diferentes pressões, invertendo estes valores (Tabela 16, Gráfico 12) obtiveram-se as constantes cinéticas pelo modelo linear de Lineweaver-Burk (Tabela 17), este valor foi posteriormente confirmado pelo modelo não linear de Michaelis-Menten (Tabela 19) recorrendo à ferramenta MATLAB.

Tabela 15: Valores da actividade da peroxidase em função das diferentes concentrações de fenol, para 100, 200 e 350 MPa a 30°C.

[fenol] (mM)	Actividade a 100MPa	Actividade a 200MPa	Actividade a 350MPa
	($\mu\text{mol}/\text{min}$)	($\mu\text{mol}/\text{min}$)	($\mu\text{mol}/\text{min}$)
4,00E+00	2,694	2,873	2,257
8,00E+00	3,930	4,103	3,723
2,40E+01	6,458	6,478	4,001
4,00E+01	8,171	7,936	4,739
8,00E+01	9,908	8,458	4,478
1,20E+02	10,12	8,782	4,570
1,60E+02	10,97	8,813	4,357
2,00E+02	10,27	ND	ND
2,40E+02	9,934	9,003	5,230

ND-não determinado

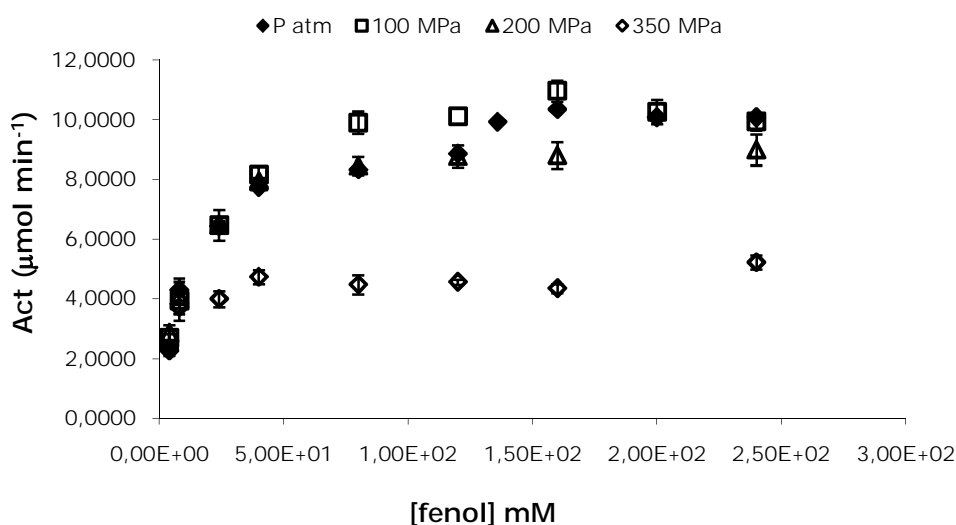


Gráfico 11: Representação das diferentes concentrações de fenol, em função da actividade da enzima peroxidase, para 0,1, 100, 200 e 350 MPa, para 30°C. As barras de erro verticais representam o desvio padrão (DP) (duas determinações para cada).

Tabela 16: Valores do inverso da actividade da peroxidase em função do inverso das diferentes concentrações de fenol, para 100, 200 e 350 MPa a 30°C.

1/[fenol] (mM) ⁻¹	1/Actividade a 100MPa (µmol/min) ⁻¹	1/Actividade a 200MPa (µmol/min) ⁻¹	1/Actividade a 350MPa (µmol/min) ⁻¹
2,50E-01	3,71E-01	3,48E-01	4,43E-01
1,25E-01	2,54E-01	2,44E-01	2,69E-01
4,17E-02	1,55E-01	1,54E-01	2,50E-01
2,50E-02	1,22E-01	1,26E-01	2,11E-01
1,25E-02	1,01E-01	1,18E-01	2,23E-01
8,33E-03	9,88E-02	1,14E-01	2,19E-01
6,25E-03	9,12E-02	1,13E-01	2,30E-01
5,00E-03	9,74E-02	ND	ND
4,17E-03	1,01E-01	1,11E-01	1,91E-01

ND-não determinado

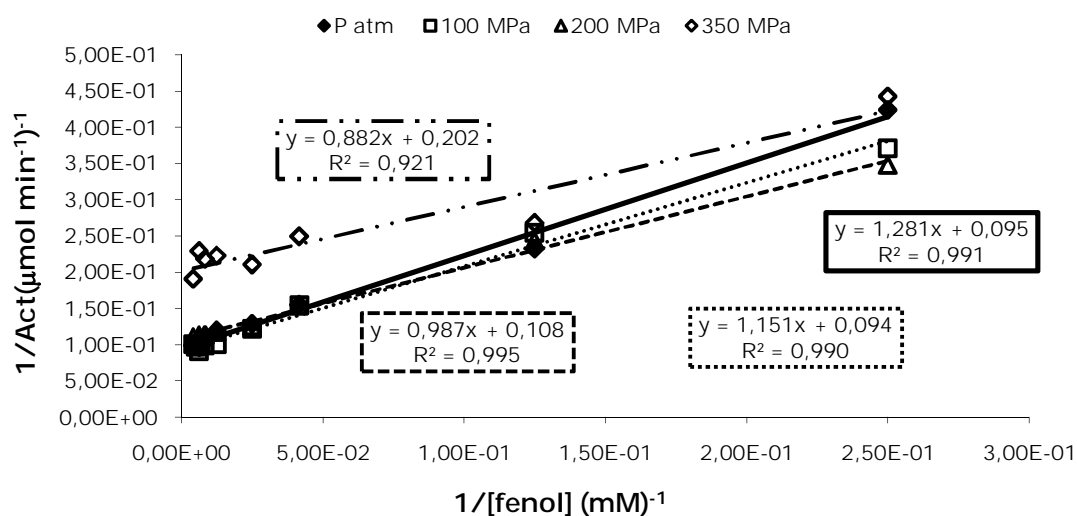


Gráfico 12: Representação dos resultados segundo o modelo linear de Lineweaver-Burk. Inverso da actividade da peroxidase em função do inverso das diferentes concentrações de fenol, a 0.1, 100, 200 e 350 MPa a 30°C.

Tabela 17: Valores das constantes cinéticas, calculadas com base no modelo de Lineweaver-Burk, para 0.1, 100, 200 e 350 MPa a 30°C.

Patm	100 MPa		200 MPa		350 MPa	
$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_M (mM)	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_M (mM)	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_M (mM)	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
10,55	13,51	10,70	12,30	9,276	9,153	5,099
						4,667

Para comparar, recorreu-se também ao modelo não linear de Michaelis-Menten para calcular as constantes cinéticas (Tabela 18, Gráfico 13).

Tabela 18: Valores da actividade da peroxidase em função das diferentes concentrações de fenol, para o modelo não linear de Michaelis-Menten, a 100, 200 e 350 MPa a 30°C.

[fenol] (mM)	Actividade teórica a 100MPa ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Actividade teórica a 200MPa ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Actividade teórica a 350MPa ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
4,00E+00	2,39E+00	2,73E+00	2,48E+00
8,00E+00	3,93E+00	4,24E+00	3,32E+00
2,40E+01	6,93E+00	6,71E+00	4,29E+00
4,00E+01	8,17E+00	7,59E+00	4,56E+00
8,00E+01	9,44E+00	8,42E+00	4,78E+00
1,20E+02	9,96E+00	8,74E+00	4,86E+00
1,36E+02	1,01E+01	8,82E+00	4,88E+00
1,60E+02	1,02E+01	8,91E+00	4,90E+00
2,00E+02	1,04E+01	9,01E+00	4,92E+00
2,40E+02	1,05E+01	9,08E+00	4,94E+00

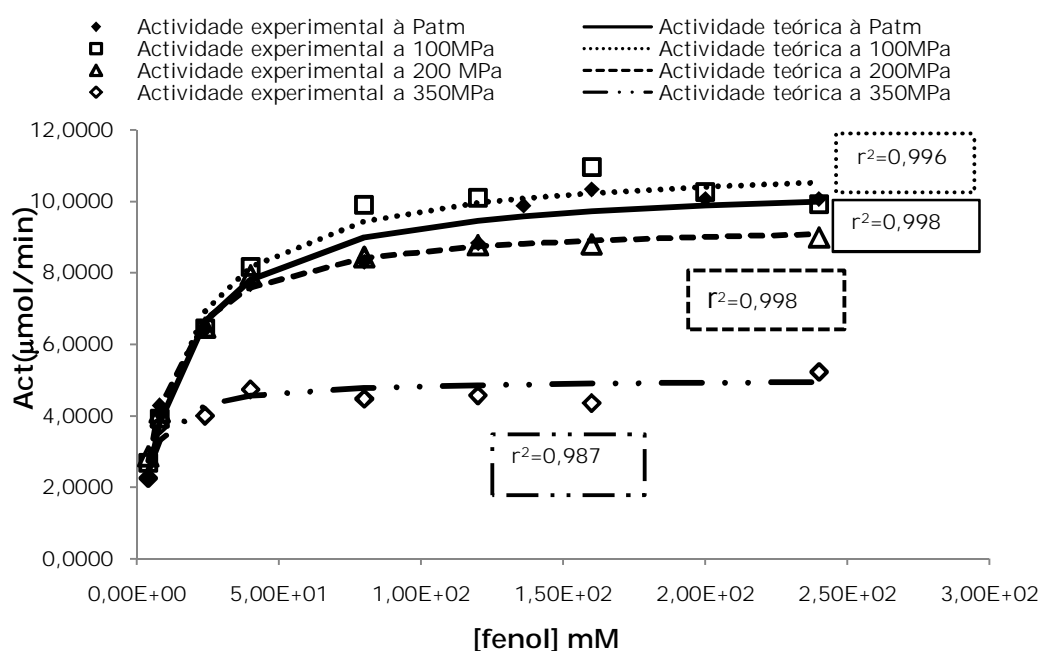


Gráfico 13: Representação gráfica da actividade experimental, obtida variando a concentração de fenol no substrato a 0,1, 100, 200 e 350 MPa, a 30°C, e da actividade teórica obtida a partir dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %).

Tabela 19: Valores das constantes cinéticas, obtidas pelo modelo não linear de Michaelis-Menten, para 0.1, 100, 200 e 350 MPa a 30°C e respectivo intervalo de variação a 95% de confiança.

	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol/min}$)	K_M (mM)
Patm	10,60 (10,21 - 10,99)	14,23 (11,50 - 16,96)
100 MPa	11,19 (10,69 - 11,68)	14,74 (11,83 - 17,65)
200 MPa	9,455 (9,099 - 9,811)	9,830 (7,950 - 11,71)
350 MPa	5,022 (4,593 - 5,451)	4,096 (1,802 - 6,390)

Por comparação das Tabela 17 e Tabela 19 pode-se verificar que os valores obtidos pelo método de Lineweaver-Burk se situam geralmente dentro do intervalo de variação dos valores obtidos pelo modelo de Michaelis-Menten a 95% de confiança.

3.2- Determinação das Constantes Cinéticas em Relação ao Peróxido de Hidrogénio a 30°C

Na tabela e gráfico que se seguem (Tabela 20, Gráfico 14) encontra-se representada a actividade da POD em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para as diversas pressões estudadas. Pela inversão directa dos valores referidos anteriormente (Tabela 21, Gráfico 15), obtiveram-se as constantes cinéticas de Lineweaver-Burk (Tabela 22), recorreu-se também ao modelo não linear de Michaelis-Menten para calcular as constantes cinéticas (Tabela 23, Gráfico 16).

Tabela 20: Valores da actividade da peroxidase em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para 100, 200, 350 e 500 MPa a 30°C.

[H ₂ O ₂] (mM)	Actividade 100MPa ($\mu\text{mol/min}$)	Actividade 200MPa ($\mu\text{mol/min}$)	Actividade 350MPa ($\mu\text{mol/min}$)	Actividade 500MPa ($\mu\text{mol/min}$)
4,56E-02	1,713	2,325	1,260	1,331
1,37E-01	4,056	2,932	2,025	2,832
2,28E-01	4,886	4,936	3,341	3,250
4,56E-01	8,410	7,032	4,795	3,953
6,83E-01	8,625	8,133	4,951	3,827
9,11E-01	10,54	8,910	5,101	3,521
1,37E+00	11,01	8,778	4,919	4,736

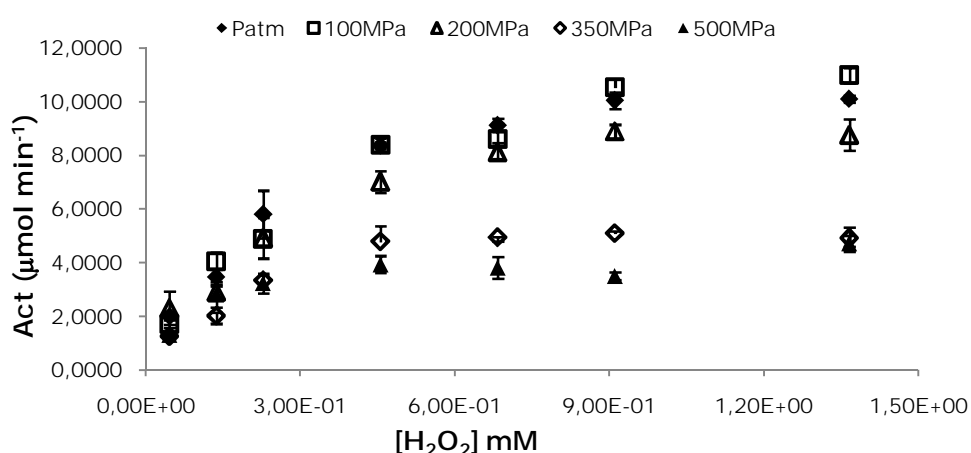


Gráfico 14: Representação da actividade da enzima peroxidase em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa, para 30°C. As barras de erro verticais representam o desvio padrão (DP) (duas determinações para cada).

Tabela 21: Valores do inverso da actividade da peroxidase em função do inverso das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para 100, 200, 350 e 500 MPa a 30°C.

$1/[H_2O_2]$ (mM) ⁻¹	1/Actividade a 100MPa ($\mu\text{mol/min}$) ⁻¹	1/Actividade a 200MPa ($\mu\text{mol/min}$) ⁻¹	1/Actividade a 350MPa ($\mu\text{mol/min}$) ⁻¹	1/Actividade a 500MPa ($\mu\text{mol/min}$) ⁻¹
2,20E+01	ND	4,30E-01	7,94E-01	7,52E-01
7,32E+00	2,47E-01	ND	4,94E-01	3,53E-01
4,39E+00	2,05E-01	2,03E-01	2,99E-01	3,08E-01
2,20E+00	1,19E-01	1,42E-01	2,09E-01	2,53E-01
1,46E+00	1,16E-01	1,23E-01	2,02E-01	2,61E-01
1,10E+00	9,48E-02	1,12E-01	1,96E-01	ND
7,32E-01	9,08E-02	1,14E-01	2,03E-01	2,11E-01

ND-não determinado

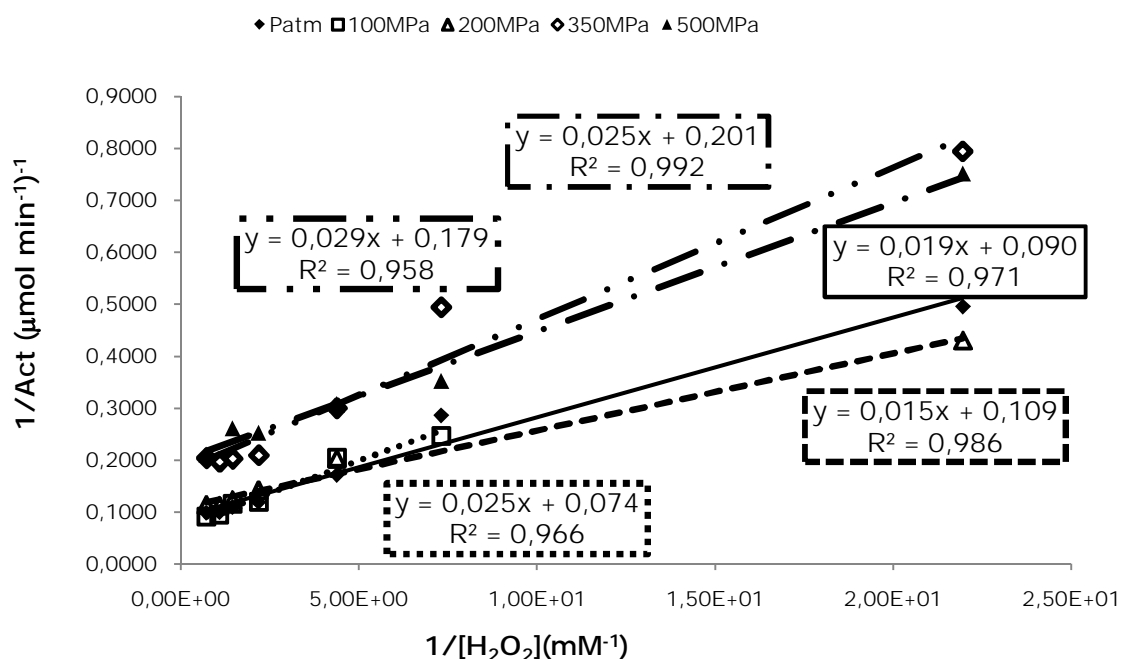


Gráfico 15: Representação dos resultados segundo o modelo linear de Lineweaver-Burk. Inverso da actividade da peroxidase em função do inverso das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, a 0,1, 100, 200, 350 e 500 MPa a 30°C.

Tabela 22: Valores das constantes cinéticas, calculadas com base no modelo de Lineweaver-Burk, para 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa a 30°C.

	Patm	100MPa	200MPa	350MPa	500MPa
$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	11,22	13,57	9,217	5,587	4,973
K_M (mM)	0,217	0,339	0,137	0,163	0,123

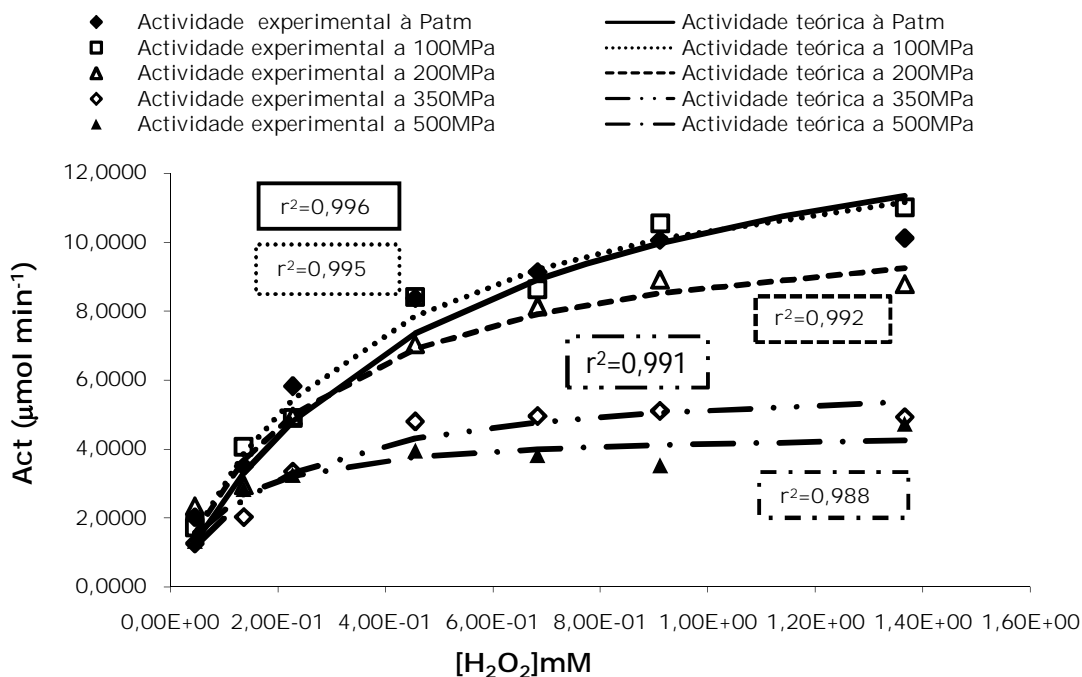


Gráfico 16: Representação gráfica da actividade experimental, obtida variando a concentração de peróxido de hidrogénio no substrato a 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa, a 30°C, e da actividade teórica obtida a partir dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %).

Tabela 23: Valores das constantes cinéticas, obtidas pelo modelo não linear de Michaelis-Menten, para 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa a 30°C e respectivo intervalo de variação a 95% de confiança.

	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_M (mM)
Patm	13,14 (12,11-14,18)	0,299 (0,231-0,367)
100MPa	14,14 (12,51-15,76)	0,366 (0,252-0,480)
200MPa	11,13 (9,699-12,57)	0,280 (0,171-0,388)
350MPa	6,108 (5,365-6,850)	0,193 (0,111-0,275)
500MPa	4,542 (4,014-5,071)	0,095 (0,044-0,146)

Após a observação das constantes cinéticas anteriores, obtidas pelos dois modelos, verificou-se que estas são semelhantes, tal como acontece no caso dos diferentes substratos de fenol.

3.3- Determinação das Constantes Cinéticas em Relação ao Peróxido de Hidrogénio a 20°C

Para o caso de diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio a 20°C, utilizou-se a mesma metodologia, ou seja, representou-se a concentração do peróxido de hidrogénio em função da actividade (Tabela 24, Gráfico 17), e pela sua inversão directa (Tabela 25, Gráfico 18), retirou-se o valor das constantes cinéticas correspondentes ao modelo linear de Lineweaver-Burk (Tabela 26), os valores das constantes cinéticas foram confirmados com recurso ao modelo não linear de Michaelis-Menten, após a representação da actividade teórica em função das diferentes concentrações (Tabela 27, Gráfico 19), retirou-se assim as constantes cinéticas referentes a este modelo (Tabela 28).

Tabela 24: Valores da actividade da peroxidase em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para 100, 200, 350 e 500 MPa a 20°C.

[H ₂ O ₂] (mM)	Actividade 100MPa (μmol/min)	Actividade 200MPa (μmol/min)	Actividade 350MPa (μmol/min)	Actividade 500MPa (μmol/min)
4,56E-02	1,124	1,213	0,595	0,506
1,37E-01	2,155	2,420	1,154	1,095
2,28E-01	3,568	3,509	2,243	1,86
4,56E-01	5,245	5,069	2,979	ND
6,83E-01	6,688	5,628	3,185	ND
9,11E-01	6,364	5,864	3,156	2,272
1,37E+00	6,335	5,716	3,156	2,596

ND-não determinado

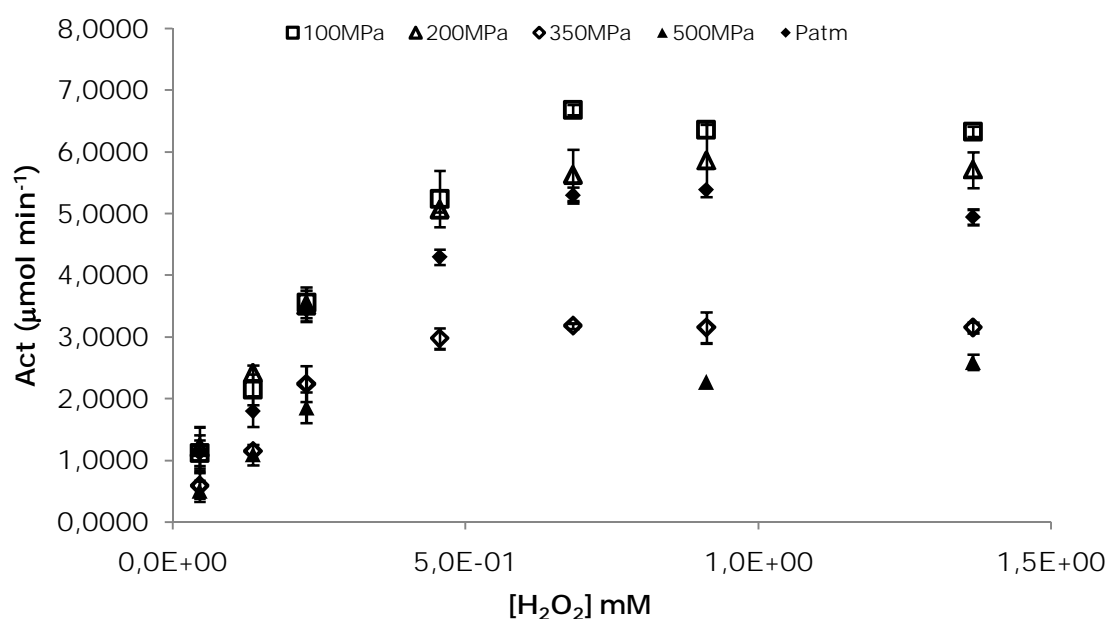


Gráfico 17: Representação da actividade da enzima peroxidase, em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa, para 20°C. As barras de erro verticais representam o desvio padrão (DP) (duas determinações para cada).

Tabela 25: Valores do inverso da actividade da peroxidase em função do inverso das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para 100, 200, 350 e 500 MPa a 20°C.

1/[H ₂ O ₂] (mM) ⁻¹	1/Actividade a 100MPa (μmol/min) ⁻¹	1/Actividade a 200MPa (μmol/min) ⁻¹	1/Actividade a 350MPa (μmol/min) ⁻¹	1/Actividade a 500MPa (μmol/min) ⁻¹
2,20E+01	8,89E-01	8,25E-01	1,68E+00	1,98E+00
7,32E+00	4,64E-01	4,13E-01	8,67E-01	9,13E-01
4,39E+00	2,80E-01	2,85E-01	4,46E-01	5,38E-01
2,20E+00	1,91E-01	1,97E-01	3,36E-01	ND
1,46E+00	1,50E-01	1,78E-01	3,14E-01	ND
1,10E+00	1,57E-01	1,71E-01	3,17E-01	4,64E-01
7,32E-01	1,58E-01	1,75E-01	3,17E-01	3,85E-01

ND-não determinado

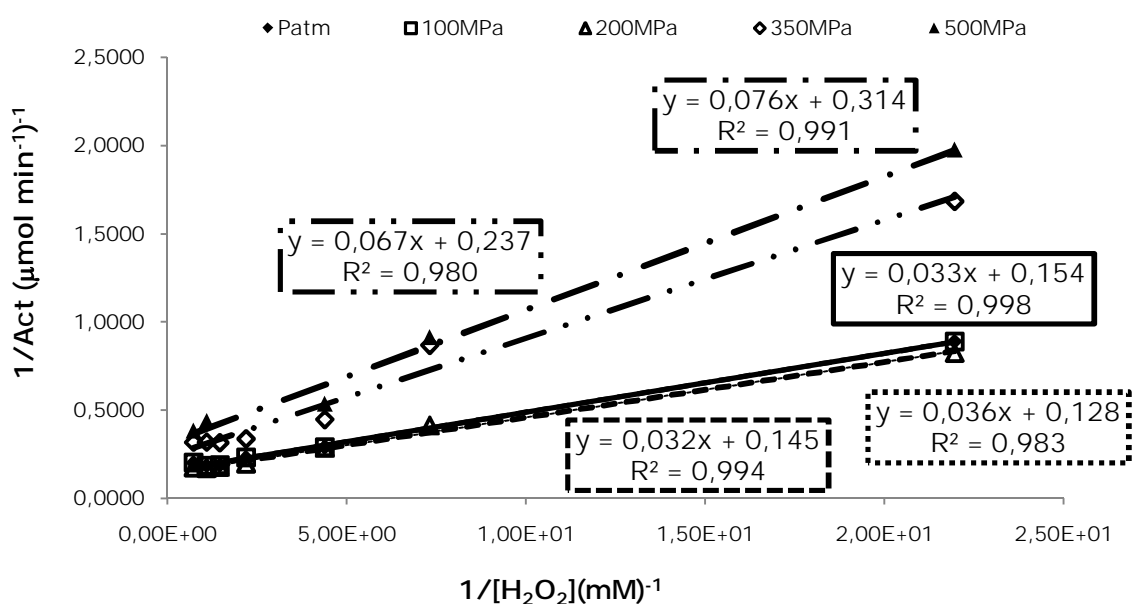


Gráfico 18: Representação dos resultados segundo o modelo linear de Lineweaver-Burk. Inverso da actividade da peroxidase em função do inverso das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, a 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa a 20°C.

Tabela 26: Valores das constantes cinéticas, calculadas com base no modelo de Lineweaver-Burk, para 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa a 20°C.

	Patm	100MPa	200MPa	350MPa	500MPa
$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	6,489	7,831	6,920	4,757	3,181
K_M (mM)	0,217	0,279	0,218	0,326	0,243

Tabela 27: Valores da actividade da peroxidase em função das diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, para o modelo não linear de Michaelis-Menten, a 100, 200, 350 e 500 MPa a 20°C.

[H ₂ O ₂] (mM)	Actividade teórica a 100MPa ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Actividade teórica a 200MPa ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Actividade teórica a 350MPa ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Actividade teórica a 500MPa ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
4,56E-02	1,12E+00	1,20E+00	6,62E-01	6,03E-01
1,37E-01	2,65E+00	2,70E+00	1,55E+00	1,27E+00
2,28E-01	3,65E+00	3,59E+00	2,11E+00	1,64E+00
4,56E-01	5,09E+00	4,78E+00	2,91E+00	ND
6,83E-01	5,87E+00	5,37E+00	3,33E+00	ND
9,11E-01	6,35E+00	5,72E+00	3,59E+00	2,42E+00
1,37E+00	6,92E+00	6,13E+00	3,89E+00	2,55E+00

ND-não determinado

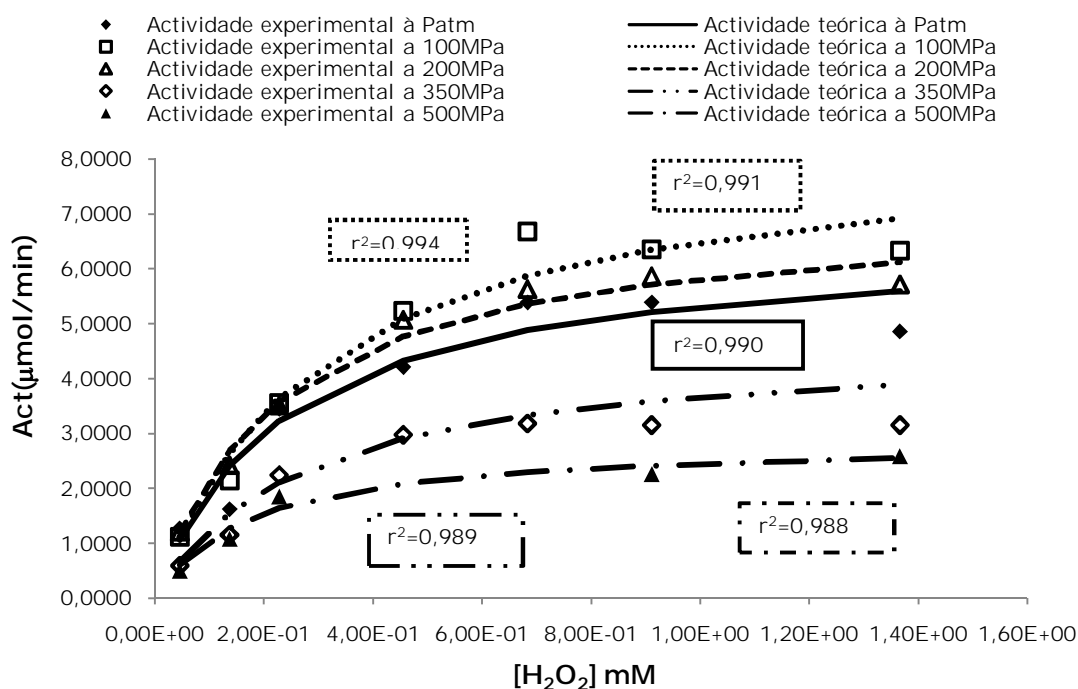


Gráfico 19: Representação gráfica da actividade experimental, obtida variando a concentração de peróxido de hidrogénio no substrato a 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa, a 20°C, e da actividade teórica obtida a partir dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten.

Tabela 28: Valores das constantes cinéticas, obtidas pelo modelo não linear de Michaelis-Menten, para 0.1, 100, 200, 350 e 500 MPa a 20°C.

	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol/min}$)	K_M (mM)
Patm	6,462 (5,597-7,328)	0,233 (0,132-0,334)
100MPa	8,433 (7,230-9,636)	0,299 (0,174-0,424)
200MPa	7,141 (6,414-7,868)	0,225 (0,150-0,301)
350MPa	3,952 (3,403-4,500)	0,214 (0,114-0,313)
500MPa	2,970 (2,492-3,448)	0,181 (0,088-0,274)

Os valores obtidos são semelhantes para os dois modelos. Comparando estas constantes cinéticas com as constantes cinéticas obtidas para o peróxido de hidrogénio a 30°C, verificou-se uma diminuição acentuada da velocidade máxima e da constante de K_M , para as diferentes pressões.

3.4- Variação da constante cinética com a pressão

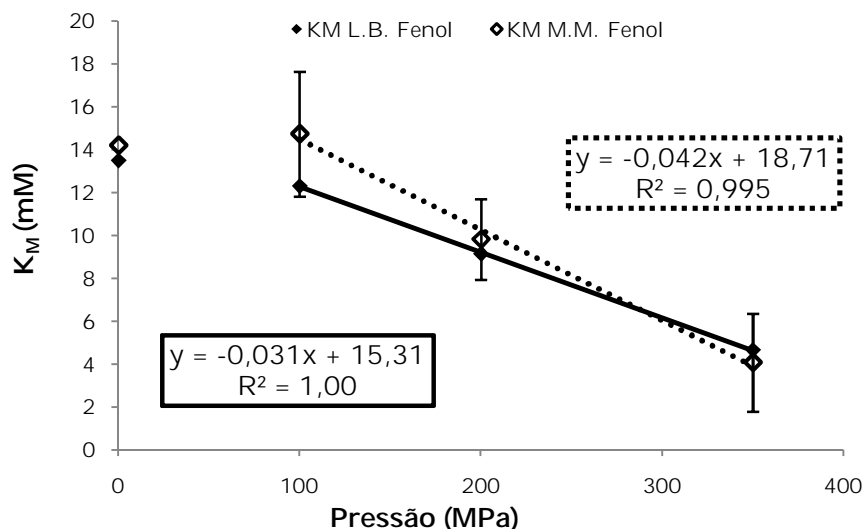


Gráfico 20: Representação dos valores de K_M segundo os dois modelos, o modelo linear de Lineweaver-Burk e o modelo não linear de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %), para o caso do fenol a diferentes pressões, a uma temperatura de 30°C.

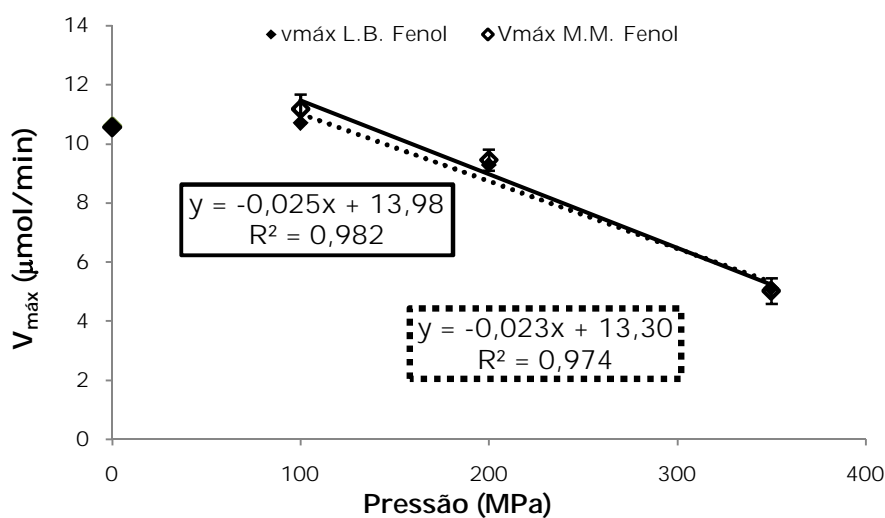


Gráfico 21: Representação dos valores de $V_{máx}$ segundo os dois modelos, o modelo linear de Lineweaver-Burk e o modelo não linear de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %), para o caso do fenol a diferentes pressões, a uma temperatura de 30°C.

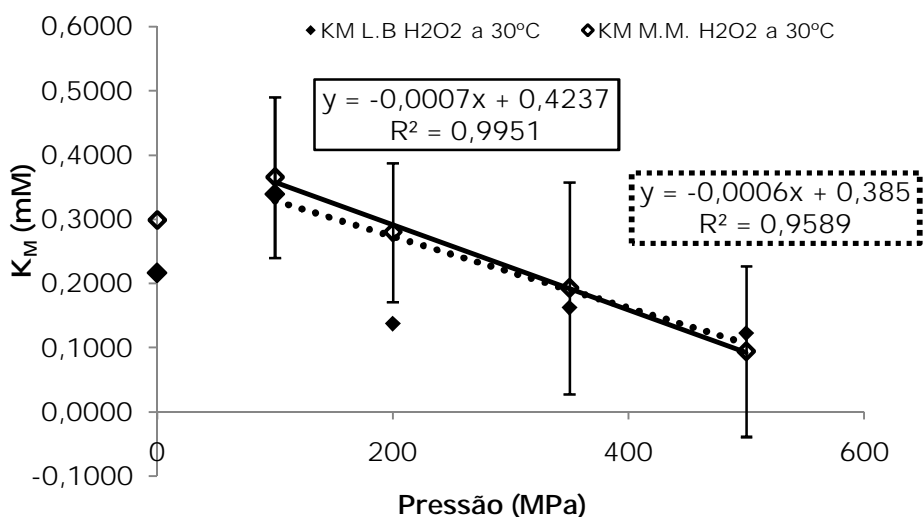


Gráfico 22: Representação dos valores de K_M segundo dois modelos, o modelo linear de Lineweaver-Burk e o modelo não linear de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %), para o caso do peróxido de hidrogénio a diferentes pressões, a uma temperatura de 30°C.

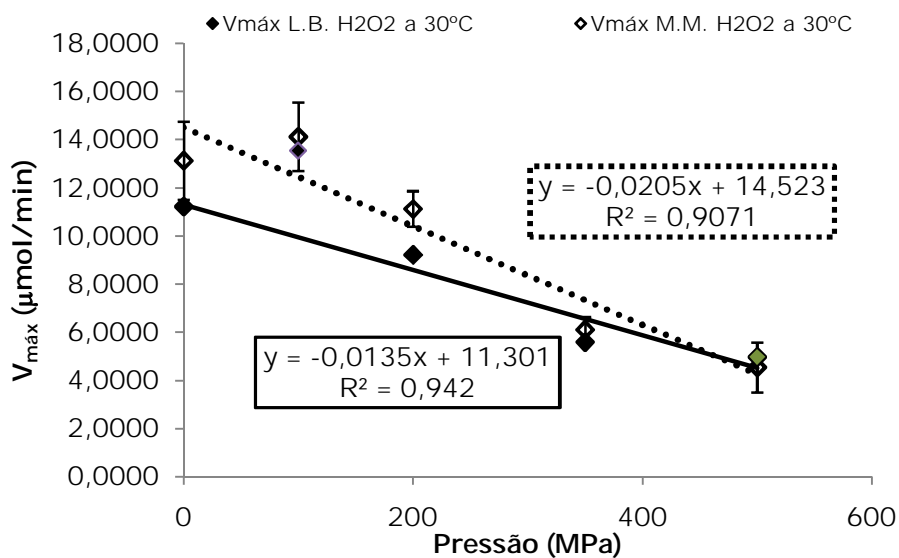


Gráfico 23: Representação dos valores de $V_{máx}$ segundo dois modelos, o modelo linear de Lineweaver-Burk e o modelo não linear de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %), para o caso do peróxido de hidrogénio a diferentes pressões, a uma temperatura de 30°C.

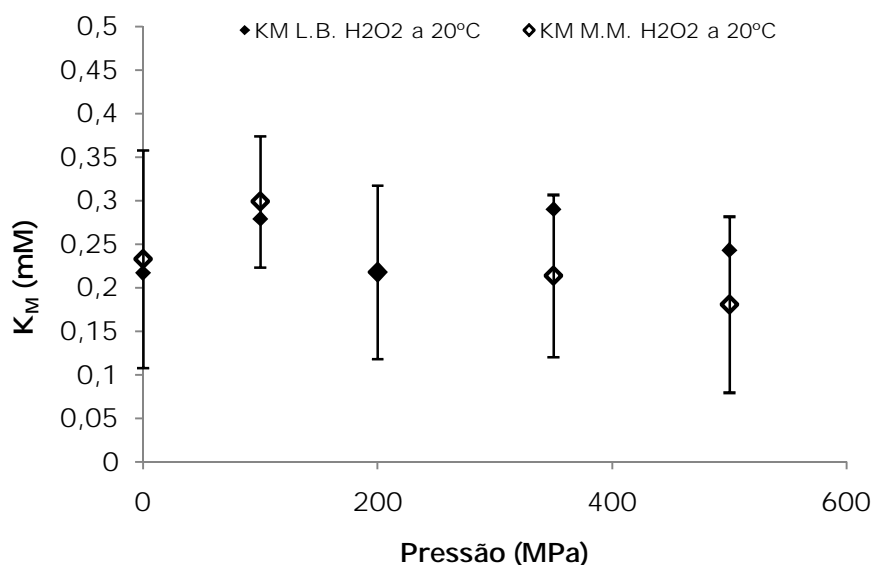


Gráfico 24: Representação dos valores de K_M segundo dois modelos, o modelo linear de Lineweaver-Burk e o modelo não linear de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %), para o caso do peróxido de hidrogénio a diferentes pressões, a uma temperatura de 20°C.

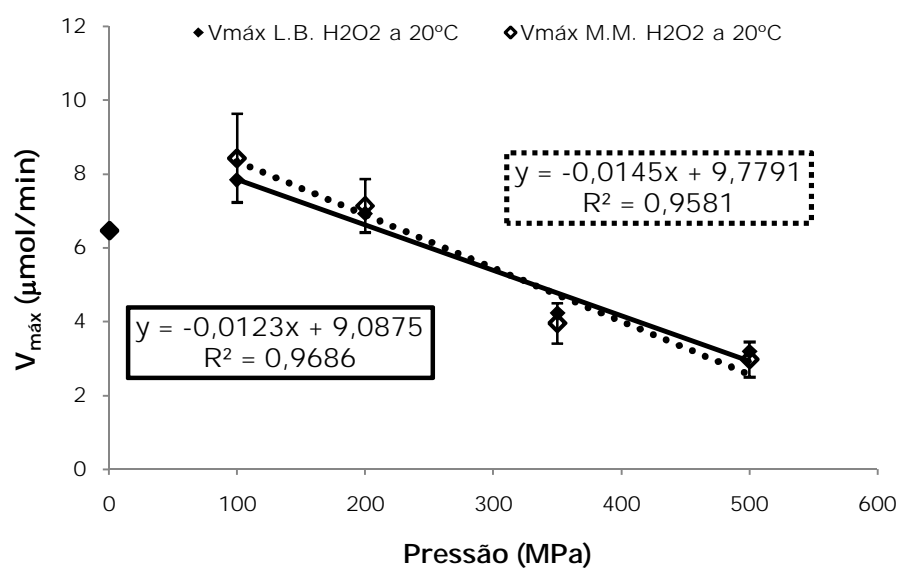


Gráfico 25: Representação dos valores de $V_{máx}$ segundo dois modelos, o modelo linear de Lineweaver-Burk e o modelo não linear de Michaelis-Menten (com grau de confiança de 95 %), para o caso do peróxido de hidrogénio a diferentes pressões, a uma temperatura de 20°C.

Considerando os valores obtidos para as constantes cinéticas, verificou-se que a velocidade máxima apresenta um ligeiro aumento à pressão de 100 MPa. Pressões relativamente baixas induzem a activação de enzimas monoméricas, como é o caso da peroxidase. Este aumento é devido possivelmente, ao facto de que a pressões relativamente baixas a estrutura primária das enzimas não é afectada, já que as ligações covalentes se mantêm intactas. A estrutura secundária das enzimas é afectada, visto que as pontes de hidrogénio são favorecidas a pressões baixas, sendo estas ligações responsáveis por esta estrutura. Este estabelecimento de pontes de hidrogénio pode resultar numa ligeira diminuição de volume, a esta pressão sem que esta se deva à desnaturação da enzima, logo esta diminuição de volume favorece a reacção quando submetida à pressão (princípio de *Le Chatelier*). Quando se aumenta a pressão para 200 MPa a velocidade máxima da reacção começa a diminuir, tendência que se confirma com o aumento da pressão para 350 MPa e 500 MPa, onde a velocidade máxima sofre uma queda cada vez mais acentuada, à medida que se aumenta a pressão. Esta diminuição a pressões elevadas, pode possivelmente ser explicada pelo facto do volume do complexo enzima-substrato, ser maior que o volume da enzima e substrato separados, pelo que sob pressão a reacção se torna mais lenta. Estes resultados indicam que a reacção é caracterizada por um volume de activação positivo, como se confirma pelo valor calculado mais à frente.

Com recurso à visualização dos gráficos 20 ao 25, verificou-se que a velocidade máxima e o K_M , têm na sua maioria uma dependência linear com a pressão, na gama estudada.

No que se refere aos valores de K_M , uma diminuição deste parâmetro indica que a pressão aumenta a afinidade da enzima para o substrato, pelo que este efeito tenderá a diminuir a actividade.

Pode visualizar-se pelos gráficos anteriores (Gráfico 20 a 25), que as constantes cinéticas determinadas pelos dois métodos (regressão linear e regressão não linear) são na sua maioria semelhantes, havendo maior

diferença nos valores de K_M determinados pelos dois métodos, para o caso do peróxido de hidrogénio a 30°C, nas pressões de 0.1 e 200 MPa.

É de realçar o maior erro na estimativa do K_M para o H_2O_2 a 20°C e 30°C, relativamente aos valores calculados para o fenol. A razão para estes resultados não é conhecida.

3.5- Efeito da pressão na actividade da peroxidase

Como se mostra mais à frente, a enzima não é afectada nesta gama de pressões, ou seja, o efeito da pressão é apenas sobre a reacção em estudo.

Tabela 29: Resultados experimentais da actividade relativa da peroxidase, para diferentes pressões e diferentes substratos de fenol a 30°C.

	Pressão (MPa)		
	100	200	350
[fenol] (mM)	Actividade relativa		
4	1,143	1,219	0,958
8	0,979	0,954	0,866
40	1,362	1,024	0,612
80	1,284	1,015	0,537
120	1,137	1,016	0,529
160	1,060	0,851	0,421
240	0,985	0,893	0,519

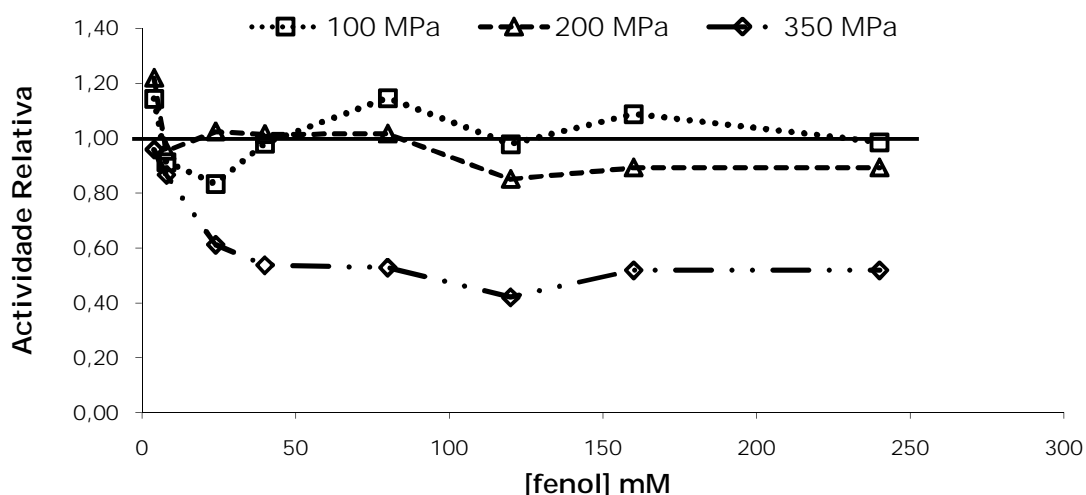


Gráfico 26: Representação da actividade relativa da enzima peroxidase, em função da variação da concentração de fenol, para 30°C.

Analisando o gráfico e tabela anteriores (Tabela 29, Gráfico 26), verifica-se que para 100 MPa, não há grande diferença relativamente à pressão atmosférica. Para 200 MPa verifica-se um comportamento semelhante, ou seja, as diferenças entre a reacção levada a cabo à pressão atmosférica e a reacção a 200 MPa são mínimas. No que se refere à reacção a 350 MPa, verifica-se uma descida acentuada na actividade, particularmente para valores mais elevados de concentração de fenol.

Tabela 30: Resultados experimentais da actividade relativa da peroxidase, para diferentes pressões e diferentes substratos de peróxido de hidrogénio a 30°C.

[H ₂ O ₂] (mM)	Pressão (MPa)			
	100	200	350	500
	Actividade relativa			
4,56E-02	0,850	1,153	0,625	0,660
1,37E-01	1,163	0,841	0,581	0,812
2,28E-01	0,840	0,848	0,574	0,558
4,56E-01	1,005	0,840	0,573	0,472
6,83E-01	0,944	0,891	0,542	0,419
9,11E-01	1,048	0,886	0,507	0,350
1,37E+00	1,088	0,867	0,486	0,468

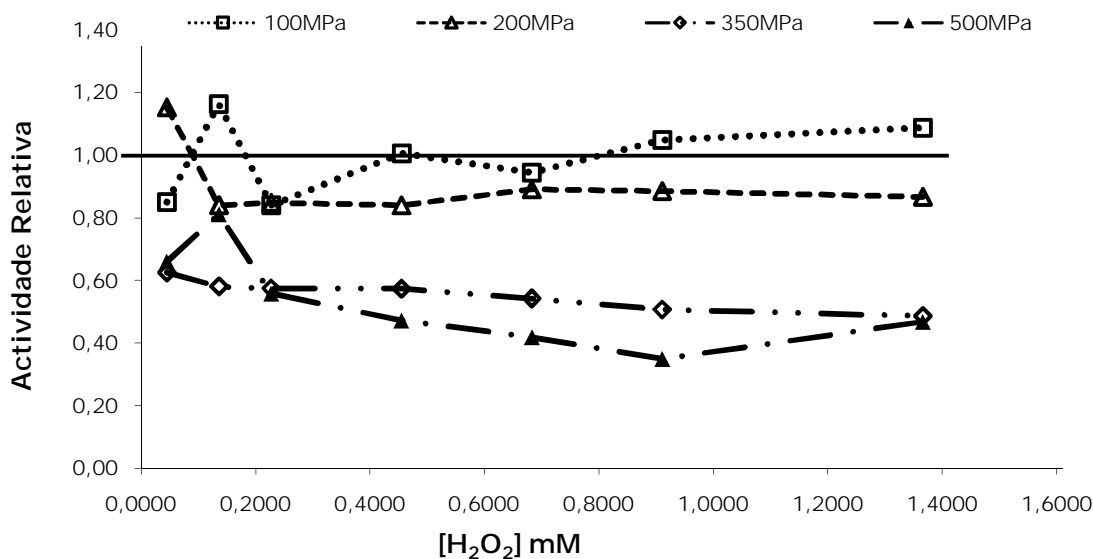


Gráfico 27: Representação da actividade relativa da enzima peroxidase, em função da variação da concentração de peróxido de hidrogénio a 30°C.

Pela análise anterior (Tabela 30, Gráfico 27), pode verificar-se que o sistema reaccional a 100 MPa, não tem grande diferença relativamente à pressão atmosférica. Os restantes sistemas reaccionais têm uma actividade inferior à da pressão atmosférica, ou seja, a actividade da peroxidase diminui à medida que a pressão aumenta, particularmente para valores mais elevados de concentração de peróxido de hidrogénio.

Tabela 31: Resultados experimentais da actividade relativa da peroxidase, para diferentes pressões e diferentes substratos de peróxido de hidrogénio a 20°C.

[H ₂ O ₂] (mM)	Pressão (MPa)			
	100	200	350	500
	Actividade relativa			
4,56E-02	1,000	1,079	0,529	0,450
1,37E-01	1,196	1,343	0,641	0,608
2,28E-01	1,034	1,017	0,650	0,539
4,56E-01	1,219	1,178	0,692	0,596
6,83E-01	1,261	1,061	0,601	ND
9,11E-01	1,180	1,087	0,585	0,400
1,37E+00	1,279	1,155	0,637	0,524

ND-não determinado

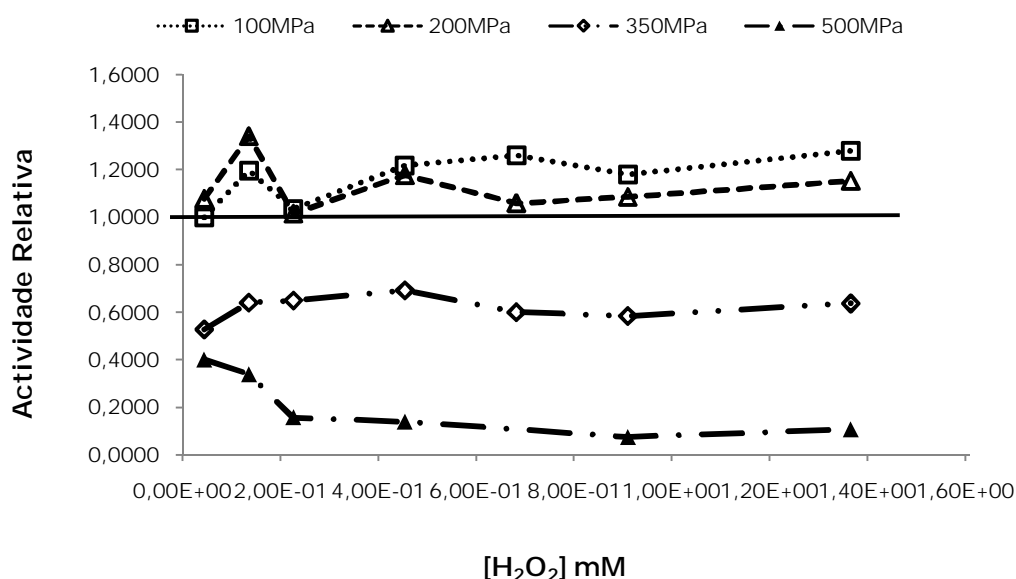


Gráfico 28: Representação da actividade relativa da enzima peroxidase, em função da variação da concentração de peróxido de hidrogénio a 20°C.

Analisando os dados anteriores (Tabela 31, Gráfico 28), verifica-se que para 100 MPa e 200 MPa a actividade da enzima peroxidase é superior à actividade à pressão atmosférica. Para as pressões de 350 e 500 MPa a actividade relativa é inferior à da pressão atmosférica, sendo que diminui à medida que se aumenta a pressão. Nesta gama de pressão, verifica-se uma diminuição na actividade, pelo que se pode concluir que a estas pressões a actividade da enzima é menor.

4- Volume de Activação

O princípio de *Le Chatelier*, diz que qualquer fenómeno de transição de fase, alteração da conformação molecular ou reacção química, que tem como consequência uma redução de volume é favorecido pelo aumento de pressão e, consequentemente quando a alteração é acompanhada de um aumento de volume, verifica-se uma inibição com o aumento da pressão.

O volume de activação pode ser positivo, quando se verifica um aumento de volume do complexo activado. Pode ser igual a zero, se a reacção estiver em equilíbrio, ou pode ser negativo se o volume do complexo activado for inferior ao volume dos reagentes.

O volume de activação (V_a), é dado pela equação de Eyring[30]:

$$V_a = - RT \left(\frac{\partial \ln k}{\partial P} \right)_T$$

O volume de activação está relacionado com a dependência entre a constante de velocidade (k) e a pressão (P), a temperatura constante.

Neste caso de estudo o volume de activação é obtido pela equação:

$$\ln k = (- V_a/RT) (P-P_0) + \ln k_0$$

Onde R representa a constante dos gases perfeitos e, T a temperatura em K.

Tabela 32: Valores usados para o cálculo do volume de activação da reacção catalisada pela peroxidase.

	Fenol	H ₂ O ₂ a 30°C	H ₂ O ₂ a 20°C
Pressão (MPa)	ln($V_{máx}$)	ln($V_{máx}$)	ln($V_{máx}$)
100	2,370	2,608	2,058
200	2,227	2,221	1,935
350	1,629	1,720	1,560
500	ND	1,604	1,157

ND-não determinado

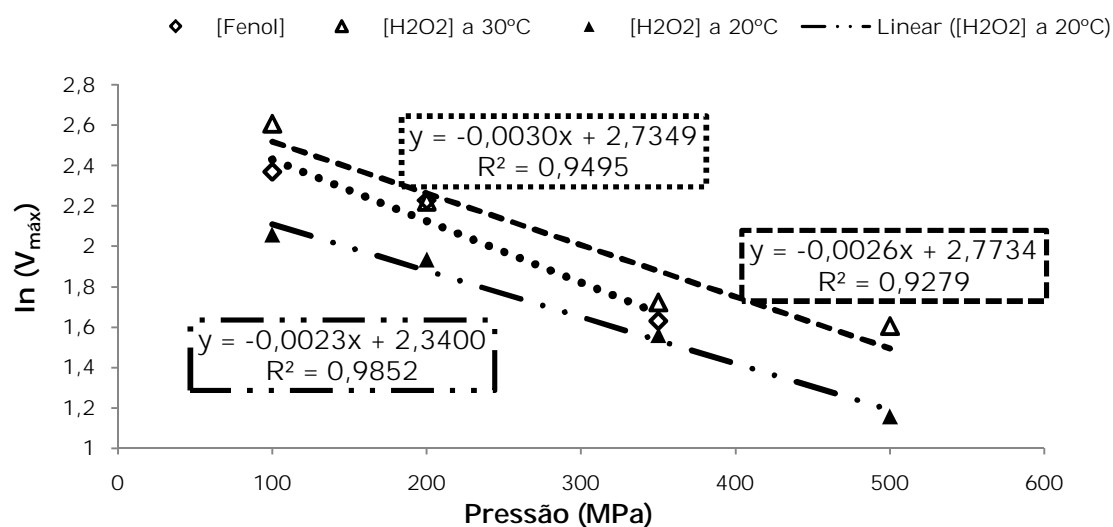


Gráfico 29: Representação da pressão versus $\ln(V_{\text{máx}})$.

A partir da representação gráfica de $\ln(V_{\text{máx}})$ em função da pressão (Tabela 32, Gráfico 29), calcula-se o volume de activação respectivo, através do declive da recta (Tabela 33).

Tabela 33: Valores dos volumes de activação referentes aos diferentes substratos, nomeadamente, fenol a 30°C, peróxido de hidrogénio a 30°C e peróxido de hidrogénio a 20°C.

	T (K)	Va (cm ³ mol ⁻¹)
Fenol 30°C	303,15	7,561
H ₂ O ₂ 30°C	303,15	6,553
H ₂ O ₂ 20°C	293,15	5,606

Os dados indicam que a temperatura parece diminuir o volume de activação, o que terá que ser confirmado com experiência a outra temperatura. Os volumes de activação são positivos para os três casos estudados, ou seja, a reacção em estudo é inibida na gama de pressões estudada.

5- Determinação da Estabilidade da Peroxidase em Tampão Tris-HCl

5.1- Actividade da Peroxidase após ser submetida a diferentes pressões

Com o intuito de estudar o efeito da pressão na estabilidade e actividade da enzima peroxidase, colocou-se diferentes extractos de enzima a diferentes pressões (Tabela 34 à Tabela 36, Gráfico 30 ao Gráfico 32)

Tabela 34: Valores da absorvância a 510 nm, medida ao longo da reacção, com o extracto de peroxidase submetido à pressão de 100MPa durante 10 minutos e com o extracto de peroxidase mantido à pressão atmosférica.

Tempo (min)	Abs (510nm) a 100MPa	Abs (510nm) a 0.1 MPa
10	0.015	ND
20	0.044	0.047
30	0.063	0.070
38	0.079	0.089
57	ND	ND
67	0.150	ND

ND-não determinado

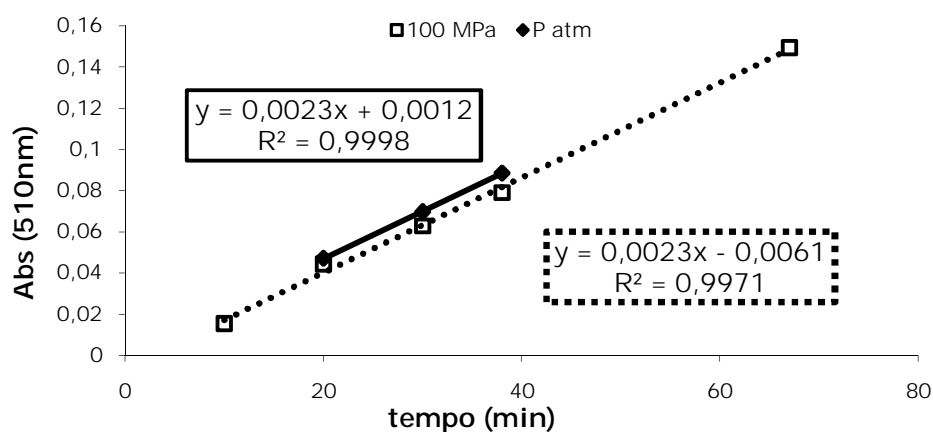


Gráfico 30: Representação dos resultados, obtidos com os dois extractos de peroxidase o que foi submetido a 100MPa durante 10 minutos e, o que ficou à pressão atmosférica. O declive da recta (m) corresponde à actividade da peroxidase, em unidades de Abs 510nm/min.

Tabela 35: Valores da absorvância a 510 nm, medida ao longo da reacção, com o extracto de peroxidase submetido à pressão de 200MPa durante 10 minutos e com o extracto de peroxidase mantido à pressão atmosférica.

Tempo (min)	Abs (510nm) a 200MPa	Abs (510nm) a 0.1 MPa
12	0.036	0.029
20	0.081	0.068
28	0.100	0.074
34	0.128	0.114
42	0.146	0.132
54	0.161	0.173
63	0.179	0.189
81	ND	0.220

ND-não determinado

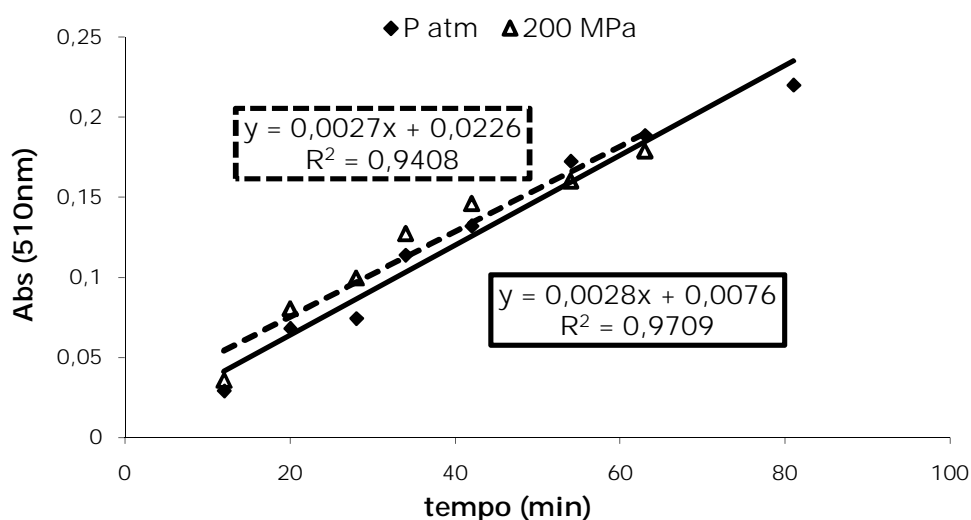


Gráfico 31: Representação dos resultados, obtidos com os dois extractos de peroxidase o que foi submetido a 200MPa durante 10 minutos e, o que ficou à pressão atmosférica. O declive da recta (m) corresponde à actividade da peroxidase, em unidades de Abs 510nm/min.

Tabela 36: Valores da absorvância a 510 nm, medida ao longo da reacção, com o extracto de peroxidase submetido à pressão de 350MPa durante 10 minutos e com o extracto de peroxidase mantido à pressão atmosférica.

Tempo (min)	Abs (510nm) a 350MPa	Abs(510nm) a 0.1 MPa
12	0.020	ND
20	0.034	0.075
33	0.063	0.098
43	0.077	0.128
51	0.093	ND
61	0.136	ND

ND-não determinado

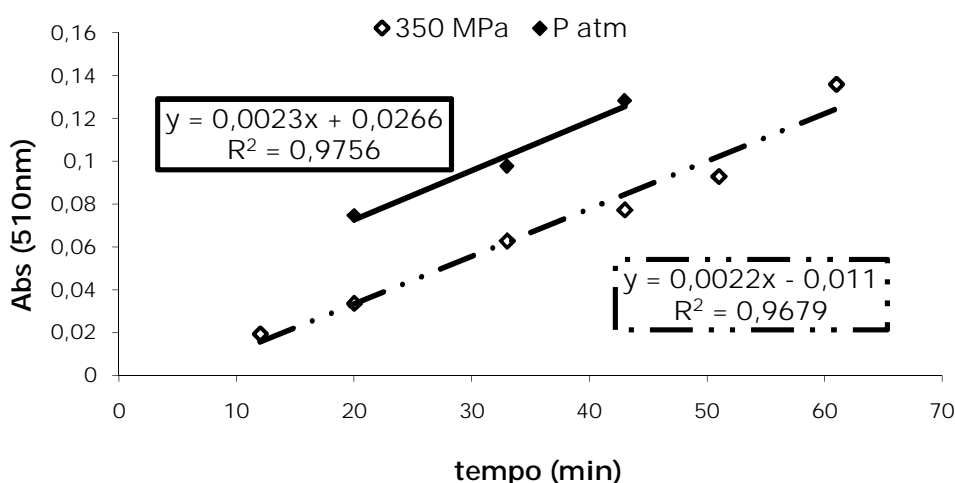


Gráfico 32: Representação dos resultados, obtidos com os dois extractos de peroxidase o que foi submetido a 350MPa durante 10 minutos e, o que ficou à pressão atmosférica. O declive da recta (m) corresponde à actividade da peroxidase, em unidades de Abs 510nm/min.

Os testes reaccionais feitos com os diferentes extractos de enzima, quer os que foram submetidos à pressão atmosférica, quer os que foram sujeitos às diferentes pressões (100, 200 e 350 MPa), decorreram em simultâneo, portanto os erros que possam ter ocorrido, afectaram da mesma forma os diferentes extractos quer os submetidos à pressão, quer os que ficaram à pressão atmosférica.

Tabela 37: Valores da actividade relativa da peroxidase a diferentes pressões.

Pressão (MPa)	Act. Relativa (%)
100	100.0
200	96.43
350	95.65

Comparando as diferentes actividades da peroxidase, as que foram submetidas a alta pressão e as que foram mantidas à pressão atmosférica, verifica-se que nesta gama de pressões a estabilidade da enzima não é afectada pela pressão (Tabela 37). As diferenças verificadas podem considerar-se dentro da variação experimental.

6- Determinação da Energia de Activação a Diferentes Temperaturas

A equação de Arrhenius relaciona a constante de velocidade com a temperatura, sendo que o logaritmo natural (ln) da constante de velocidade em função do inverso da temperatura (1/T), origina em quase todos os casos uma linha recta.

A equação de Arrhenius [6]:

$$\ln(k) = \ln(A) - \left(\frac{E_a}{R}\right) \times \left(\frac{1}{T}\right)$$

Onde A é o factor pré-exponencial e E_a é a energia de activação. Quanto maior a energia de activação, maior é o efeito da variação de temperatura numa reacção.

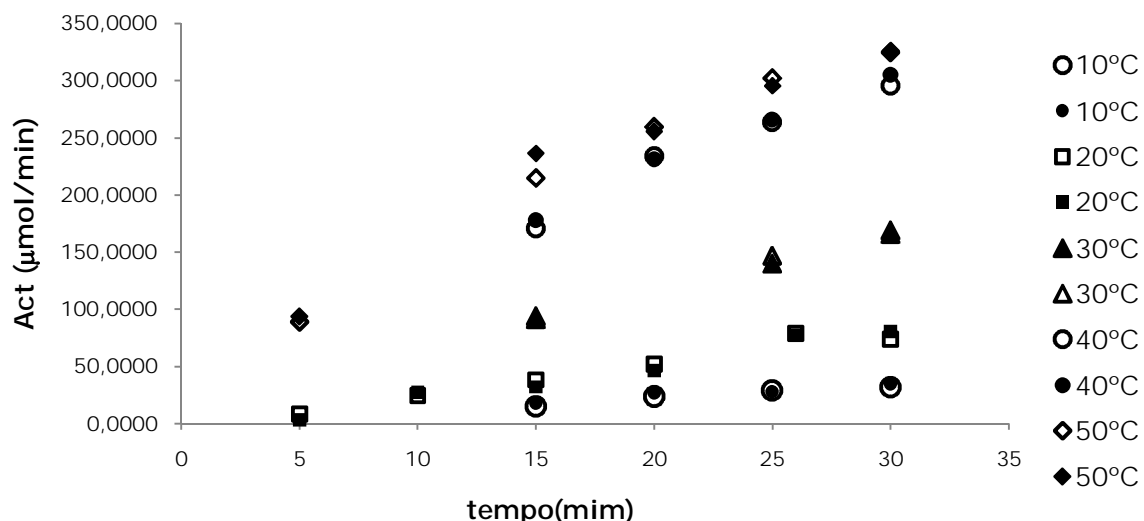


Gráfico 33: Representação da actividade em função do tempo de reacção, para o mesmo meio reaccional a diferentes temperaturas, nomeadamente, 10, 20, 30, 40 e 50°C, à pressão atmosférica.

No gráfico anterior (Gráfico 33), visualizou-se a influência da temperatura na actividade da peroxidase, através da formação do produto cromóforo, concluindo-se que à medida que a temperatura aumenta a actividade da peroxidase também aumenta.

Tabela 38: Valores essenciais ao cálculo do logaritmo da actividade da peroxidase, para diferentes temperaturas.

T(°C)	T (k)	1/TR	Actividade (µmol/min)	ln(Actividade)
10	283,15	4,00E-04	13,93	2,634
20	293,15	4,00E-04	36,89	3,608
30	303,15	4,00E-04	64,37	4,165
40	313,15	4,00E-04	105,8	4,661
50	323,15	4,00E-04	120,1	4,788

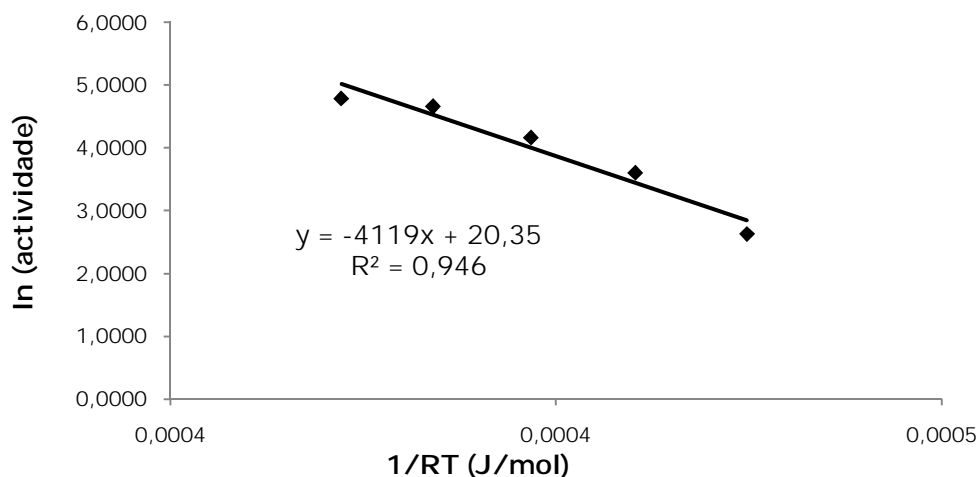


Gráfico 34: Representação do logaritmo da actividade em função do inverso da temperatura e da constante dos gases perfeitos (1/TR). Do declive (m) da recta retira-se a energia de activação (Ea).

A fim de obter a energia de activação (Ea) da reacção em estudo, representou-se o logaritmo da actividade da POD em função de 1/RT (Tabela 38, Gráfico 34), e com base no declive da recta obtida calcula-se a Ea.

$$m = -Ea$$

$$Ea = 41193 \text{ J/mol} = 41,19 \text{ kJ/mol}$$

Comparando este valor de energia de activação com o valor obtido para o caso da peroxidase da azeitona (99,1 KJ/mol), verifica-se que neste caso a energia de activação é bastante inferior[6].

Parte IV. Conclusão

Actualmente, pouco se sabe sobre o impacto da alta pressão na actividade de enzimas, incluindo a enzima peroxidase. Por esse motivo, este trabalho suscitou interesse, baseando-se essencialmente na determinação dos parâmetros cinéticos, por dois modelos, o modelo linear de Lineweaver-Burk e o modelo não linear de Michaelis-Menten, assim como determinar o efeito da alta pressão na actividade e estabilidade da enzima peroxidase. O primeiro objectivo deste trabalho consistiu em otimizar um procedimento que permitisse medir a actividade da peroxidase a diferentes pressões, e pará-la após 20 minutos do início da reacção, garantindo assim que a reacção estaria na fase inicial.

Após a realização do presente trabalho, concluiu-se que a enzima peroxidase não é afectada na gama de pressões estudada, nomeadamente 100, 200 e 350 MPa, visto as diferentes actividades da peroxidase, quer as que foram sujeitas a altas pressões quer as que ficaram à pressão atmosférica serem muito próximas, no entanto, a reacção em estudo é afectada pela pressão, sendo inibida pelo aumento desta, ou seja, para pressões de 100, 200, 350 e 500 MPa, verificou-se uma diminuição da actividade da peroxidase à medida que se aumentou a pressão.

A actividade da peroxidase comporta-se de forma semelhante para os diferentes substratos e para as diferentes temperaturas, sendo que à pressão de 100 MPa, a actividade da peroxidase é bastante próxima da actividade à pressão atmosférica, sendo isto explicado pelo facto de para pressões relativamente baixas a estrutura primária das enzimas não ser afectada, já a estrutura secundária é afectada pelo aumento de pressão, causando uma ligeira diminuição de volume, favorecendo assim a reacção (princípio de *Le Chatelier*).

As constantes cinéticas (K_M e $V_{máx}$) determinadas para a pressão atmosférica, com recurso a dois modelos, nomeadamente, o modelo linear de Lineweaver-Burk e o modelo não linear de Michaelis-Menten,

assemelham-se às reportadas na literatura [6]. Essas mesmas constantes determinadas sob o efeito de altas pressões, seguem na sua maioria uma tendência, diminuem à medida que a pressão aumenta, de um modo linear.

A reacção em estudo apresenta três volumes de activação positivos, nomeadamente, 7.56, 6.55 e 5.61 cm³ mol⁻¹, para os diferentes substratos de, fenol a 30°C, peróxido de hidrogénio a 30°C e peróxido de hidrogénio a 20°C, respectivamente. Significando que a reacção em causa é inibida pela pressão.

A reacção presente neste caso de estudo, foi realizada a diferentes temperaturas, nomeadamente, 10, 20, 30, 40 e 50°C à pressão atmosférica, sendo que a actividade da enzima peroxidase aumenta com a temperatura, sendo esta variação caracterizada por uma energia de activação positiva (41.19 kJ/mol).

Para trabalho futuro, será interessante prosseguir este trabalho, estudando o efeito da pressão na actividade da enzima e nas constantes cinéticas a outras temperaturas, para verificar como o V_a varia com a temperatura.

Bibliografia

1. Cabral J. M. S., Aires-Barros M. R., Gama M. *Engenharia Enzimática*: Lidel- coleção Biotec; 2003.
2. Veitch N. C. *Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme*. *Phytochemistry* 2004;65:249-259.
3. Yuan Z. Y., Jiang T. J. *Handbook of food enzymology*; 2003.
4. Lemos M. A., Oliveira J. C., Saraiva J. A. *Influence of pH on the thermal inactivation kinetics of horseradish peroxidase in aqueous solution*. *Food Science and Technology* 2000;33:362-368.
5. Quaglia G. B., Gravina R., Paperi R., Paoletti F. *Effect of high pressure treatments on peroxidase activity, ascorbic acid content and texture in green peas*. *Food Science and Technology* 1996;29:552-555.
6. Saraiva J. A., Nunes C. S., Coimbra M. A. *Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase*. *Food Chemistry* 2007;101:1594-1602.
7. Segura M. d. I. M., Levin G., Miranda M. V., Mendive F. M., Targovnik H. M., Cascone O. *High-level expression and purification of recombinant horseradish peroxidase isozyme C in SF-9 insect cell culture*. *Process Biochemistry* 2005;40:795-800.
8. Nunes C. S. C. *Purificação da peroxidase de azeitona negrinha do Douro: identificação e caracterização das principais isoenzimas*. Tese de Mestrado, Departamento de Química da Universidade de Aveiro; 2002.
9. Liu J.-Z., Song H.-Y., Weng L.-P., Ji L.-N. *Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidase*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2002;18:225-232.
10. Kong I. C., Kim M., Bhandari A. *Aqueous phase toxicity changes resulting from horseradish peroxidase-mediated polymerization of phenols and hydroxylated polynuclear aromatic contaminants*. *Bull Environ Contam Toxicol* 2007;79:104-108.
11. Ferrari R. P., Laurenti E., Trotta F. *Oxidative 4-dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol catalyzed by horseradish peroxidase*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 1999;4:232-237.
12. Dalal S., Gupta M. N. *Treatment of phenolic wastewater by horseradish peroxidase immobilized by bioaffinity layering*. *Chemosphere* 2007;67:741-747.
13. Nicell J. A., Wright H. *A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide*. *Enzyme and Microbial Technology* 1997;21:302-310.
14. Tong Z., Qingxiang Z., Hui H., Yi L. Q. a. Z. *Removal of toxic phenol and 4-chlorophenol from waste water by horseradish peroxidase*. *Pergamon* 1997;34:893-903.
15. Khan U., Nicell J. A. *Horseradish peroxidase-catalysed oxidation of aqueous natural and synthetic oestrogens*. *Chemical Technology and Biotechnology* 2007;82:818-830.
16. Campos F. P., Dosualdo G. L., Cristianini M. *The use of high pressure technology in food processing*. *Brazilian Journal of Food Technology* 2003;6:351-357.
17. Hendrickx M., Ludikhuyze L., Broeck I. V. d., Weemaes C. *Effects of high pressure on enzymes related to food quality*. *Trends in Food Science & Technology* 1998;9:197-203.
18. Buckow R., Heinz V. *High pressure processing – a database of kinetic information*. *Chemie Ingenieur Technik* 2008;80:1081-1095.
19. Fang L., Jiang B., Zhang T. *Effect of combined high pressure and thermal treatment on kiwifruit peroxidase*. *Food Chemistry* 2008;109: 802-807.
20. Messens W., Camp J. V., Huyghebaert A. *The use of high pressure to modify the functionality of food proteins*. *Trends in Food Science & Technology* 1997;81:107-112.
21. Coelho G. L. V. *Effects of high hydrostatic pressure on foods: physical chemistry features*. *Revista universidade rural* 2002;21:105-110.

22. Boonyaratanakornkit B. B., Park C. B., Clark D. S. *Pressure effects on intra-and intermolecular interactions within proteins*. Biochimica et Biophysica Acta 2002;235-249.
23. Akyol Ç., Alpas H., Bayındırh A. *Inactivation of peroxidase and lipoxygenase in carrots, green beans, and green peas by combination of high hydrostatic pressure and mild heat treatment*. European Food Research and Technology 2006;224:171-176.
24. Soysal Ç., Soylemez Z., Bozoglu F. *Effect of high hydrostatic pressure and temperature on carrot peroxidase inactivation*. European Food Research and Technology 2004;218:152-156.
25. García A. F., Butz P., Tauscher B. *Mechanism-based irreversible inactivation of horseradish peroxidase at 500 MPa*. Biotechnology 2002;18:1076-1081.
26. Smeller L., Meersman F., Fidy J., Heremans K. *High-pressure FTIR study of the stability of horseradish peroxidase. Effect of heme substitution, ligand binding, Ca++ removal, and reduction of the disulfide bonds*. Biochemistry 2003;42:553-561.
27. Castro S. M., Saraiva J. A., Lopes-da-Silva J. A., Delgadillo I., Loey A. V., Smout C., Hendrickx M. *Effect of thermal blanching and of high pressure treatments on sweet green and red bell pepper fruits (Capsicum annuum L.)*. Food Chemistry 2008;107:1436-1449.
28. Garcia-Palazon A., Suthanthangjai W., Kajda P., Zabetakis I. *The effects of high hydrostatic pressure on b-glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (Rubus idaeus) and strawberry (Fragaria ananassa)*. Food Chemistry 2004;88: 7-10.
29. Fricks A. T., Souza D. P. B., Oestreicher E. G., Antunes O. A. C., Girardi J. S., Oliveira D., Dariva C. *Evaluation of radish (Raphanus sativus L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide*. Supercritical Fluids 2006;38: 347-353.
30. Liu X., Gao Y., Peng X., Yang B., Xu H., Zhao J. *Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (Beta vulgaris L.) extract with high pressure carbon dioxide*. Innovative Food Science and Emerging Technologies 2008;9:24-31.

